

**Molekulare Untersuchung anaerob induzierter
Transkriptionsfaktoren aus Tomate
(*Lycopersicon esculentum*)**

Von der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina
zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades einer
Doktorin der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

genehmigte
D i s s e r t a t i o n

von Simone Sell
aus Kassel

1. Referent:

Prof. Dr. Reinhard Hehl

2. Referent:

Prof. Dr. Ralf-Rainer Mendel

eingereicht am:

11. März 2004

mündliche Prüfung (Disputation) am:

19. Mai 2004
2004

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät, vertreten durch den Mentor, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Publikationen

Sell, S. & Hehl, R. ABZ1, an anaerobically induced repressor interacts with a SPX domain protein possibly involved in anaerobic signal transduction. Eingereicht

Tagungsbeiträge

Sell, S., Geffers, R., Bülow, L., Cerff, R., Düring, K. & Hehl, R. Expression of the maize *GapC4* promoter in solanaceous host plants. (Poster) 7th Conference of the International Society for Plant Anaerobiosis (ISPA), Nijmegen (The Netherlands) (2001)

Sell, S. & Hehl, R. Anaerobic transcription factors of tomato. (Poster) 7th International Congress of Plant Molecular Biology, Barcelona (Spain) (2003)

Abkürzungsverzeichnis

AACO	anaerobe ACC Oxidase
ABA	Abscisinsäure
ABZ	anaerobes bZIP Protein
ACC	Aminocyclopropan-1-carboxylsäure
ACE	ACGT Element
AD	Aktivierungsdomäne
ADH	Alkoholdehydrogenase
ADP	Adenosindiphosphat
AIL	anaerobes IDS4-like Protein
ALF	Automated Laser Fluorescence
ANA	anaerobes NAC Protein
ANP	anaerobes Protein
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BD	Bindungsdomäne
bp	Basenpaare
CaMV	Cauliflower Mosaic Virus
cDNA	complementary DNA
cfu	colony forming unit
CIAP	Calf Intestine Alkaline Phosphatase
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
DAPI	4'-6-Diamidino-2-phenylindol
dC	Desoxycytidin
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dG	Desoxyguanosin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
ds	doppelsträngig
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EMSA	elektrophoretischer Mobilitätsshift Assay
GABA	γ -Aminobuttersäure
GapC	Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase
GBF	G-Box Bindungsfaktor
GUS	β -Glucuronidase

IDS	iron deficiency specific
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
<i>lacZ</i>	Gen der β -Galactosidase
LB	Luria Broth
LD PCR	Long Distance Polymerase Chain Reaction
LDH	Lactatdehydrogenase
LUC	Luciferase
mRNA	messenger RNA
MS	Murashige-Skoog
MUG	4-Methyl-umbelliferyl- β -D-glucuronid
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NLS	Kernlokalisierungssequenz
OD	optische Dichte
ONPG	o-Nitrophenyl- β -D-galactopyranosid
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDC	Pyruvatdecarboxylase
PMSF	Phenylmethansulfonsäurefluorid
PPi	Pyrophosphat
QDO	Quadruple Dropout (Hefeselektivmedium)
RNA	Ribonucleinsäure
SAM	Shoot Apical Meristem
SD	Synthetic Dropout (Hefeminimalmedium)
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SSH	Suppression Subtractive Hybridization
Stabw	Standardabweichung
SuSy	Saccharosesynthase
TAIR	The Arabidopsis Information Resource
T-DNA	Transfer-DNA
uORF	upstream open reading frame
UTR	untranslated region (nicht translatierter Bereich)
v/v	Volumen/Volumen
w/v	Gewicht/Volume
xg	gravity (Erdbeschleunigung)
X-Gluc	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-glucuronid
λ	Lambda (Wellenlänge)

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1	Exogener Sauerstoffmangel.....	1
1.2	Endogener Sauerstoffmangel.....	2
1.3	Signalaufnahme und –weiterleitung bei Hypoxia und Anaerobiose	2
1.4	Energiemetabolismus unter geringen Sauerstoffkonzentrationen.....	4
1.5	Regulation der Genexpression und Proteinsynthese unter anaeroben Bedingungen	5
1.6	Anaerobe Stoffwechsel-Umstellungen	7
1.7	Zellschädigung durch cytoplasmatische Ansäuerung	9
1.8	Morphologische Anpassung an sauerstoffarme Bedingungen	10
1.9	Hypoxische Akklimatisierung an Anaerobiose	11
1.10	Ziele dieser Arbeit	12
2.	Material und Methoden	13
2.1	Chemikalien.....	13
2.2	Filtermaterialien und Membranen.....	13
2.3	Radiochemikalien	13
2.4	Autoradio- und Fotografiematerialien	13
2.5	Enzymsysteme und Reagenzsätze (Kits).....	13
2.6	Verwendete Bakterien- und Hefestämme	14
2.7	Verwendete Pflanzenlinien	15
2.8	Verwendete Plasmide	15
2.9	Molekularbiologische Techniken	16
2.10	Arbeiten mit Ribonucleinsäure	16
2.10.1	Extraktion von Gesamt-RNA aus Pflanzenmaterial.....	16
2.10.2	PolyA+ mRNA Isolierung.....	17
2.10.3	Konzentrationsbestimmung von RNA	17
2.10.4	Northern Blot Analyse	17
2.11	Suppression Subtractive Hybridization (SSH).....	18
2.12	cDNA Bank Synthese	19
2.12.1	Elektrotransformation der cDNA Bank in <i>Escherichia coli</i>	19
2.13	Rekombinante Proteinexpression und Aufreinigung	20

2.13.1	Rekombinante Expression anaerob induzierter Proteine aus Tomate	20
2.13.2	De- und renaturierende Aufreinigung von rekombinantem ABZ1 und ANA	22
2.13.3	SDS-PAGE	23
2.13.4	Quantitative Proteinbestimmung nach Bradford.....	23
2.14	Analyse von Protein-DNA-Interaktionen.....	24
2.14.1	Random Binding Site Selection (RBSS) Assay	24
2.14.2	Elektrophoretische Gelshift Experimente	26
2.14.2.1	DNA-Fragmente (Sonden) und Kompetitoren	26
2.14.3	Native Polyacrylamidgelelektrophorese der Protein-DNA-Bindungsreaktionen	28
2.15	Transiente Transformation von Pflanzenmaterial.....	29
2.15.1	Untersuchung der Kernlokalisation von ABZ1 und ANA in Zwiebelepidermiszellen	29
2.15.1.1	DNA-Konstrukte	29
2.15.1.2	Transformation von Zwiebelepidermiszellen	31
2.15.1.3	Histochemischer GUS-Test (Zwiebelepidermis)	32
2.15.2	Funktionelle Untersuchung von ABZ1 und ANA im transienten System.....	32
2.15.2.1	DNA-Konstrukte für Cotransformations-Untersuchungen	32
2.15.2.2	Transformation von Tabak- und Tomaten-Blattmaterial	34
2.15.2.3	Proteinextrakt-Herstellung für GUS- und LUC-Aktivitätsmessungen	36
2.15.2.4	Quantitativer GUS-Test.....	36
2.15.2.5	Quantitativer LUC-Test.....	37
2.15.2.6	Berechnung der Reportergen-Aktivität	37
2.16	Stabile Transformation von Tomate	38
2.17	Yeast Two Hybrid System.....	39
2.17.1	Konstrukte der Yeast Two Hybrid Untersuchungen	40
2.17.2	Herstellung einer cDNA AD Fusionsbank	41
2.17.3	Screen auf ABZ1-Interaktionspartner.....	41
2.17.4	Herstellung kompetenter Hefezellen	43
2.17.5	Hefetransformation	44
2.17.6	Plasmidminipräparation aus Hefe (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	44
2.17.7	Quantitativer β -Galactosidase Test	44
2.18	Computer-gestützte Analysen	45

3.	Ergebnisse.....	47
3.1	Anaerob exprimierte Gene aus der Tomate	47
3.1.1	Untersuchung der transkriptionellen Induktion einiger differentiell exprimierter Gene unter Anaerobiose	50
3.2	Strukturelle und funktionelle Analyse von ANA	51
3.2.1	ANA gehört zur Familie der NAC Transkriptionsfaktoren	51
3.2.2	ANA wird in den Nucleus transportiert	54
3.2.3	ANA besitzt eine Transkriptionsaktivierungsdomäne	55
3.2.4	ANA bindet sequenzspezifisch an den CaMV 35S Promotor	57
3.2.5	Im transienten System bewirkt ANA keine Aktivierung des CaMV 35S Promotors.....	59
3.3	Strukturelle und funktionelle Analyse von ABZ1	61
3.3.1	ABZ1 ist ein bZIP Transkriptionsfaktor	61
3.3.2	ABZ1 gehört einer Familie kleiner bZIP Transkriptionsfaktoren an	63
3.3.3	Die basische Domäne vermittelt die Kernlokalisierung von ABZ1.....	65
3.3.4	ABZ1 bindet sequenzspezifisch an die G-Box Core Sequenz	66
3.3.5	ABZ1 bindet spezifisch an den CaMV 35S Promotor.....	71
3.3.6	Die DNA-Bindungsdomäne von ABZ1 ist im N-Terminus lokalisiert	72
3.3.7.	Die DNA-Bindung durch ABZ1 erfordert ein Dimer, dessen Monomere über funktionsfähige basische Domänen verfügen	73
3.3.8	ABZ1 bildet <i>in vitro</i> Dimere.....	74
3.3.9	Coexpression von ABZ1 führt zu reduzierter Aktivität des CaMV 35S Promotors.....	76
3.3.10	Der CaMV 35S Promotor wird unter Anaerobiose schwächer exprimiert als unter aeroben Bedingungen	78
3.3.11	Die Effekte der Anaerobiose auf den CaMV 35S Promotor in transgenen Tomatenpflanzen sind heterogen	79
3.3.12	Selektion von potentiellen Interaktionspartnern des ABZ1.....	81
3.3.13	Untersuchung der transkriptionellen Induktion von potentiellen ABZ1 Interaktionspartnern unter Anaerobiose	84
3.3.14	AIL ist ein potentieller Interaktionspartner von ABZ1 und enthält eine SPX-Domäne.....	85
3.3.15	LeACO5 - ein neues Mitglied der ACC Oxidase Genfamilie aus Tomate	88

4.	Diskussion	91
4.1	Effizienz der SSH-Methode	91
4.2	Gegenüberstellung anaerob induzierter Gene aus Tomate und Arabidopsis ..	91
4.3	ANA – ein Anaerobiose-spezifischer Aktivator der Transkription?	93
4.4	ABZ1 – ein Mitglied der S-Klasse von bZIP Faktoren	96
4.5	DNA-Bindungsspezifität von ABZ1	97
4.6	Aspekte der Homo- und Heterodimerisierung von ABZ1	99
4.7	ABZ1 - ein anaerob spezifischer Repressor der Transkription?.....	100
4.8	ABZ1-Interaktionspartner	102
4.8.1	AIL – ein potentiell durch Eisenmangel induziertes Protein und seine Bedeutung für Anaerobiose.....	105
4.8.2	AIL als Komponente der anaeroben Signaltransduktion	106
4.8.3	Eine neue anaerob spezifische ACC Oxidase aus Tomate	107
5.	Zusammenfassung	110
6.	Literaturverzeichnis.....	113
7.	Anhang	128
7.1	Yeast Two Hybrid Analyse der ANA Aktivierungsdomäne	128
7.2	Funktionelle Analyse von ANA durch transiente Coexpression	129
7.3.1	Funktionelle Analyse von ABZ1 im transienten System (unter CaMV 35S Kontrolle)	130
7.3.2	Funktionelle Analyse von ABZ1 im transienten System (unter C1 Kontrolle)	131
7.4	Vergleich der aeroben und anaeroben CaMV 35S Promotor Aktivität im transienten System.....	132
7.5	Yeast Two Hybrid Analyse auf ABZ1-Interaktionspartner	133
7.6	Katalogisierte DNA Proben	135
7.7	Katalogisierte Glycerinkulturen.....	138

1. Einleitung

Pflanzen sind, wie Tiere, obligat aerobe Organismen und sind auf externe Sauerstoffversorgung angewiesen. Im Gegensatz zu Tieren, die u.a. spezialisierte Atmungsorgane besitzen, verfügen Pflanzen über kein effizientes System zur Bereitstellung von Sauerstoff und sind außerdem Standort gebunden (Dennis *et al.*, 2000). Sauerstoff (O_2) ist jedoch als terminaler Elektronenakzeptor der oxidativen Phosphorylierung, die den größten Teil des ATP für zelluläre Stoffwechselwege durch Regenerierung von NAD^+ aus $NADH$ zur Verfügung stellt, essentiell. Zusätzlich ist Sauerstoff in die Synthese von Häm, Sterol und Fettsäuren durch die Cytochromoxidase involviert. Bei einem Defizit an O_2 ist allerdings die Aktivität der Cytochromoxidase beeinträchtigt und die oxidative Phosphorylierung wird inhibiert (Geigenberger, 2003). Deshalb haben Pflanzen sowohl morphologische als auch metabolische Mechanismen entwickelt, die es ihnen ermöglichen, kurze, O_2 -arme Perioden zu überleben oder zu umgehen. In Abbildung 1 sind die unterschiedlichen Mechanismen, die im Folgenden erläutert werden, zusammengefasst (Geigenberger, 2003).

1.1 Exogener Sauerstoffmangel

Sauerstoffarme Bedingungen treten für Pflanzen als Folge von Überflutung und komprimierter Böden auf. Es werden zwei Überflutungsarten unterschieden: Entweder tritt ein Überschuß an Wasser ausschließlich im Bereich der Wurzeln (Rhizosphäre) auf, oder die gesamte Pflanze, einschließlich ihrer oberirdischen Teile, wird überschwemmt (Zhang *et al.* 2000). Da die Diffusion von Gasen in Wasser ca. 10000-fach langsamer verläuft als in Luft, ist der Gasaustausch zwischen Pflanzengewebe und Atmosphäre reduziert, und es entstehen hypoxische oder anaerobe Bedingungen für die Pflanze (Armstrong, 1979). Bei mikrobieller Respiration im Boden kann der Sauerstoff in der Rhizosphäre innerhalb von weniger als 24 Stunden vollständig verbraucht sein (Good und Paetkau, 1992). Dann ist das Redoxpotential im Boden erniedrigt und reduzierte Substanzen, wie NO_2^- , Mn^{2+} , Fe^{2+} und H_2S sowie Essig- und Buttersäure als Intermediate aus dem mikrobiellen Kohlenstoffmetabolismus werden akkumuliert (Drew, 1997). In phytotoxischen Konzentrationen können diese Substanzen u.a. zur Schädigung von Pflanzen beitragen. Wachstumsstop und verfrühte Seneszenz sind die Folge, was zu beträchtlichen Einbußen im Ernteertrag wirtschaftlich relevanter Nutzpflanzen führen kann (Zhang *et al.*; 2000; Dennis *et al.*, 2000; Ito *et al.*; 1999).

1.2 Endogener Sauerstoffmangel

Neben externer Unterversorgung mit O₂ wird auch eine ausschließlich endogen limitierte Sauerstoffversorgung in Pflanzen beobachtet, obwohl sie unter normalen Sauerstoffbedingungen (21% v/v) stehen. In Wurzelmeristem (Ober und Sharp, 1996) und Phloemgewebe (van Dongen *et al.*, 2003) fällt der O₂-Gehalt ab, weil es sich um metabolisch besonders aktives Gewebe mit hohem O₂-Verbrauch und ohne große interzelluläre Lufträume handelt. Außerdem sind Zellen betroffen, die nur wenige Vakuolen besitzen oder die im Zentrum eines Organs lokalisiert sind (Geigenberger, 2003). In Erbsensamen ist der Sauerstoffeintritt durch kutinisierte Zellschichten der Samenhülle behindert (Rolletscheck *et al.*, 2002).

1.3 Signalaufnahme und –weiterleitung bei Hypoxia und Anaerobiose

Wie nehmen Pflanzen Veränderungen der Sauerstoff-Konzentration wahr? Wird der Rückgang des O₂-Gehaltes in anaeroben Zellen durch ein niedriges ATP-Level oder durch cytoplasmatische Ansäuerung signalisiert? Untersuchungen in Tabak (Bucher *et al.*, 1994) und die Beobachtung, dass bereits O₂-Konzentrationen, die noch oberhalb des K_m-Wertes der Cytochromoxidase liegen, eine hypoxische Antwort verursachen, deuten vielmehr auf eine Beteiligung von Rezeptormechanismen zur Signalaufnahme hin (Abb. 1). *Rhizobium meliloti* besitzt z.B. ein Zweikomponenten-Regulationssystem (Gong *et al.*, 1998). Dieses besteht aus einer O₂-bindenden Hämoproteinkinase als Sensor und einem Transkriptionsfaktor. Dieser Transkriptionsfaktor wird nach Phosphorylierung durch die Kinase aktiviert und stimuliert als Antwort auf die verringerte O₂-Konzentration die Expression Stickstoff-fixierender Gene. Auch in Hefe ist Häm für die Aktivierung und Repression von Genen wichtig, die als Antwort auf O₂-Konzentrationsänderungen erfolgen (Zitomer und Lowry, 1992). Bei Säugetieren basiert die O₂-Signalaufnahme auf reversibler O₂-Bindung durch Hämoproteine oder auf der Produktion reaktiver Sauerstoffspezies durch NAD(P)H Oxdasen in den Mitochondrien (López-Barneo *et al.*, 2001). Zusätzlich gibt es wahrscheinlich auch andere Sauerstoffsensoren in eukaryotischen Zellen, die Eisen-unabhängig funktionieren (Quinn *et al.*, 2002).

In Maiswurzeln wurde eine Induktion von Hämoglobinen infolge von Überflutung detektiert, wodurch Häm auch in höheren Pflanzen eine Rolle in der Wahrnehmung von O₂-Konzentrationsänderungen spielen könnte (Nie *et al.*, 1996). Durch geringe O₂-Konzentrationen wird das Klasse-1 Hämoglobinen *GLB1* in Arabidopsis (Klok *et al.*, 2002) und in Gerste (Taylor *et al.*, 1994) induziert. Die Überexpression von GLB1 aus Arabidopsis führt zu einem gesteigerten Wachstum unter normalen Sauerstoff-

bedingungen sowie zu gesteigerter Toleranz gegenüber Hypoxia (Hunt *et al.*, 2002). Bei Überexpression von mutiertem GLB1 geht Hypoxia-Toleranz jedoch aufgrund der reduzierten O₂-Bindungsaffinität verloren. Diese Beobachtung zeigt, dass eine hohe Liganden-Bindungsaffinität für erhöhte Toleranz essentiell ist (Hunt *et al.*, 2002). So besitzen die meisten pflanzlichen Hämoglobine eine um ein Vielfaches höhere Affinität für Sauerstoff als die Cytochromoxidase (Trevaskis *et al.*, 1997). Daher erscheint es unwahrscheinlich, dass Hämoglobine direkt als O₂-Sensoren agieren, sondern vielmehr als Modulatoren der hypoxischen Antwort wirken. GLB1 interagiert offensichtlich mit einem O₂-detektierenden System, das auf Häm basiert. Das führt zur Induktion von Mechanismen, die einen erhöhten O₂-Eintrag erlauben, um interner Anoxia vorzubeugen, sofern externer Sauerstoff zur Verfügung steht. Andererseits wird trotz hypoxischer Bedingungen das Überleben gefördert (Geigenberger, 2003; Abb. 1).

Außerdem sind Veränderungen in der cytosolischen Ca²⁺-Konzentration an der anaeroben Signaltransduktion in Maiswurzelzellen beteiligt (Subbaiah *et al.*, 1994; Abb. 1). In Folge von Anaerobiose erfolgt ein schneller Anstieg der cytosolischen Ca²⁺-Konzentration. Wahrscheinlich ist dieser schnelle Anstieg eine Antwort auf den Abfall des pH-Wertes oder des verringerten Energiemetabolismus unter anaeroben Bedingungen (Drew, 1997).

In Arabidopsis konnte gezeigt werden, dass für die Induktion des Alkoholdehydrogenase (ADH) Gens ein G-Protein assoziierter Signaltransduktionsweg verantwortlich ist, der durch O₂-Mangel stimuliert wird (Baxter-Burrell *et al.*, 2002). Die sog. Rop (RHO-like small G protein of plants) vermittelte Signalweiterleitung aktiviert eine Oxidase, die die Produktion von H₂O₂ katalysiert. H₂O₂ stellt einen Second messenger der induzierten ADH Expression dar. Dabei scheint eine erhöhte Konzentration an Ca²⁺ wichtig zu sein, das vermutlich von der Oxidase gebunden wird.

Die Ethylensynthese ist in Wurzeln durch Hypoxia stark gefördert, wird aber durch anaerobe Bedingungen blockiert, weil für die Reaktion von ACC zu Ethylen Sauerstoff benötigt wird (He *et al.*, 1996). Die Rolle von Ethylen in der Signalweiterleitung, die während der Aerenchym-Bildung zum Zelltod führt, impliziert ebenfalls Ca²⁺ als Second messenger (Drew *et al.*, 2000).

In tierischen Zellen existiert eine Vielzahl von Mechanismen zur O₂-Signalaufnahme. Diese verfügen über ATP-sensitive K⁺-Kanäle, die auch in Arabidopsis gefunden wurden (Thomine *et al.*, 1995), sowie O₂-sensitive K⁺- und Ca²⁺-Kanäle (Franco-Obregon *et al.*, 1995). Eine mögliche Bedeutung dieser Sensoren für die Reaktionen auf geringe O₂-Verfügbarkeit ist in höheren Pflanzen noch unklar.

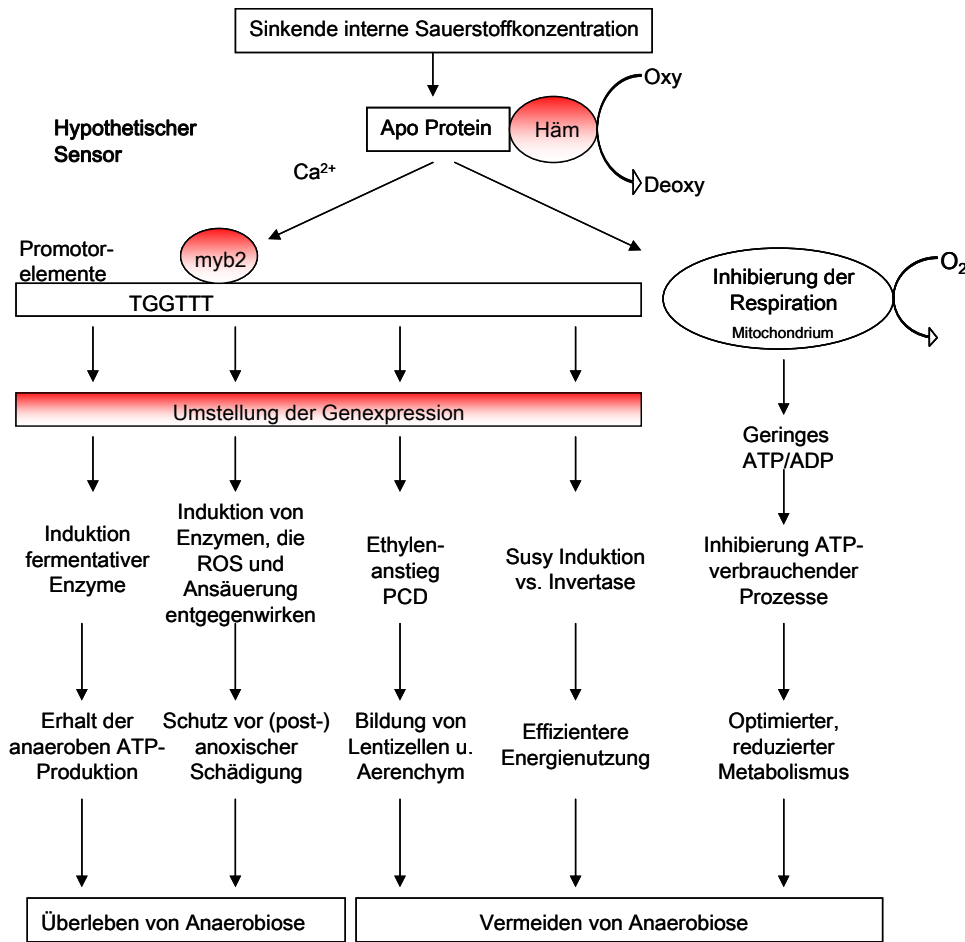


Abb. 1: Schematische Darstellung der pflanzlichen Antworten auf O_2 -Mangel (nach Geigenberger, 2003; verändert). Der Rückgang der internen O_2 -Konzentration wird von Pflanzen aufgenommen und führt zu adaptiven Reaktionen, die entweder zum Überleben unter anaeroben Bedingungen oder zur Vermeidung von Anaerobiose beitragen. ROS: reactive oxygen species; PCD: programmed cell death

1.4 Energiemetabolismus unter geringen Sauerstoffkonzentrationen

Parallel zum Rückgang der internen O_2 -Konzentration bis zu 1% sinkt das ATP/ADP Verhältnis in Pflanzengewebe (Geigenberger *et al.*, 2000; van Dongen *et al.*, 2003; Gibon *et al.*, 2002). Dies ist die Folge eingeschränkter Respiration und führt somit zur Restriktion der ATP-verbrauchenden, metabolischen Aktivität sowie zu rückläufigem Sauerstoffbedarf unter Hypoxia (Abb.1). Allerdings steigt der Redox-Zustand NADH/NAD⁺ bei sinkenden intrazellulären O_2 -Konzentrationen von über 1%, die also noch oberhalb derer liegen, die zu Fermentation führen, nicht an (Geigenberger *et al.*, 2003). Offensichtlich bleibt der aerobe Metabolismus bei verringerten intrazellulären O_2 -Konzentrationen bis zu 1% O_2 in verschiedenen Geweben relativ aktiv. Deshalb ist der Rückgang der O_2 -Konzentration und des Energiestatus unter hypoxischen Bedingungen

nicht mit der Akkumulation von Lactat oder Ethanol verbunden (Geigenberger *et al.*, 2000). Die drohende interne Anaerobiose wird durch den adaptiven Rückgang des O₂-Verbrauchs verhindert. Erst bei einem O₂-Gehalt von unter 1% ist die Glykolyse stimuliert, um der geringen ATP-Ausbeute, die aus der Fermentation resultiert, entgegenzuwirken. Die Aktivität der Cytochromoxidase ist unter Anaerobiose eingeschränkt, die ATP-Produktion mittels oxidativer Phosphorylierung inhibiert, und ATP muss durch Glykolyse gebildet werden (Ricard *et al.*, 1994). Offensichtlich verlaufen die Stress-Antworten der Pflanzen auf Hypoxia und Anaerobiose entgegengesetzt, wobei die Glykolyse bei relativ geringem O₂-Defizit zunächst reprimiert, unter anaeroben Bedingungen jedoch hochreguliert wird. Es ist unwahrscheinlich, dass das O₂-Defizit direkt inhibierend auf den Elektronentransport der oxidativen Phosphorylierung wirkt, da die O₂-Konzentration, die die koordinierte Runterregulation von Krebszyklus und Glykolyse bewirkt, noch oberhalb des K_m-Wertes der Cytochromoxidase liegt.

1.5 Regulation der Genexpression und Proteinsynthese unter anaeroben Bedingungen

Als Antwort auf O₂-Mangel reagieren Pflanzen mit einer Umstellung der Genexpression, die vermutlich durch ein System zur O₂-Signalaufnahme ausgelöst wird (Geigenberger, 2003; Abb. 1). Der großen Zahl an transkriptionell induzierten Genen steht eine vergleichsweise begrenzte Anzahl an anaeroben Proteinen gegenüber, was die Bedeutung der posttranskriptionellen Regulation verdeutlicht (Germain *et al.*, 1997; Klok *et al.*, 2002; Russell und Sachs, 1992; Sachs *et al.*, 1980). Diese Beobachtung ist auf eine inhibierte Translation vieler mRNAs aufgrund von Polysomen-Dissoziation bei Anaerobiose zurückzuführen. Allerdings wurden auch relativ kleine Polysomen entdeckt, die spezifisch anaerobe mRNAs translatieren (Bailey-Serres und Freeling, 1990; Fennoy und Bailey-Serres, 1995). Sachs *et al.* (1980 und 1996) konnten zunächst 20 anaerobe Proteine (ANP) identifizieren, deren Expression in Mais-Keimlingswurzeln auch unter anaeroben Bedingungen fortgesetzt bzw. induziert wird. Die meisten dieser ANPs sind Enzyme der Glykolyse und Fermentation. Eine Ausnahme bildet ein Homolog der Xyloglucan Endotransglycosylase, das an der Zellwandauflösung zur Aerenchymbildung beteiligt sein könnte. In den letzten Jahren wurde eine Vielzahl weiterer ANPs identifiziert, die in andere metabolische Prozesse involviert sind (Chang *et al.*, 2000). Die anaerobe Induktion des eingehend untersuchten Alkoholdehydrogenase-Gens (*ADH1*) aus Mais und Arabidopsis beruht u.a. auf Veränderungen in der Chromatinstruktur (Paul und Ferl, 1997) und eine damit verbundene Transkriptionsaktivierung (Dolferus *et al.*, 1994). Seine verstärkte Translation ist von den 5'- und 3'-nicht translatierten Bereichen

abhängig und nicht auf eine veränderte Transkriptstabilität bei Hypoxia zurückzuführen (Bailey-Serres und Dawe, 1996).

Die unter O₂-Defizit differentiell exprimierten Arabidopsis-Gene, die durch eine Microarray Analyse identifiziert wurden, lassen sich entsprechend ihres zeitlichen Expressionsprofils in 6 Klassen einteilen (Klok *et al.*, 2002). So werden unterschiedliche Gensets in zwei Phasen aktiviert oder reprimiert. Einerseits gibt es Gene, deren Expression innerhalb der ersten halben Stunde während O₂-Mangels hoch- oder runterreguliert wird. Andererseits wurden Gene identifiziert, deren Expression erst nach 2-20 Stunden auf hypoxische Bedingungen antwortet. Dennis *et al.* (2000) teilen die pflanzliche Antwort auf O₂-Mangel anhand von ANPs in drei Phasen ein. In der ersten Phase (0-4 Stunden) erfolgt die schnelle Induktion bzw. Aktivierung von Signaltransduktionskomponenten, um das zweite Stadium (4-24 Stunden) der metabolischen Adaption, einschließlich der Glykolyse und Fermentation zu aktivieren. Die dritte Phase (24-48 Stunden) ist für das Überleben der Pflanzen unter länger andauernder O₂-Limitierung nötig. Es kommt zur Expression von Enzymen, die zur Aerenchym-Bildung beitragen.

Die Analyse der nicht codierenden 5'-Bereiche von Genen, die eine ähnliche Expressionsinduktion wie ADH1 zeigen, ergab gemeinsame *cis*-regulatorische Motive. Diese entsprechen zum Großteil den regulatorischen Elementen des ADH1 Promotors und sind somit offensichtlich für die Genexpression unter Anaerobiose verantwortlich (Klok *et al.*, 2002). Dazu zählen u.a. das GC- und GT-Motiv innerhalb des ARE (Anaerobic Response Element). Die Abstände zwischen diesen beiden Motiven variieren in Abhängigkeit des betrachteten Gens von 26 bis 240 Basenpaare. Auch der anaerob-spezifische Promotor der Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase aus Mais besitzt typische Motive, wie eine halbe G-Box, eine GC-Box sowie drei GT-Boxen, die für die anaerobe Expression verantwortlich sind (Geffers *et al.*, 2000). AtMYB2, ein Transkriptionsfaktor, der durch Trocken- und Sauerstoff-Stress sowie ABA induziert wird und an das GT-Motiv des ADH1 Promotors bindet, transaktiviert diesen wahrscheinlich zusammen mit AtMYC2 (Hoeren *et al.*, 1998; Abe *et al.*, 2003). Weiterhin wurden ein G-Box-like Motiv, ein -45 Motiv des ADH1 Promotors sowie ein Motiv, das bereits durch DNA Footprinting Analyse entdeckt worden war, als spezifische, *cis*-regulatorische Elemente von Genen eines bestimmten Expressionsprofils identifiziert (Fertl und Laughner, 1989). Außerdem konnte durch eine Footprinting Analyse gezeigt werden, dass die Mais ADH1 und ADH2 Promotoren, die beide durch Anoxia induzierbar sind, sehr unterschiedliche Muster der Kernproteinbindung aufweisen (Paul und Fertl, 1991). Daher scheint das Vorhandensein von ARE-like Elementen für eine anaerobe Induktion allein nicht ausreichend zu sein. Diese Beobachtungen unterstützen die Annahme einer

koordinierten Regulation von Genen, die zu bestimmten Zeitpunkten der anaeroben Antwort exprimiert werden (Singer *et al.*, 2001). Offensichtlich werden diese Gene durch eine Kombination ähnlicher Transfaktoren kontrolliert (Klok *et al.*, 2002). Bei koordinierter Transkriptionsregulation der ANPs beruht ihre modifizierte Genexpression also wahrscheinlich auf post-transkriptionellem Processing und der Transkript-Stabilität der unterschiedlichen mRNA-Spezies (Drew, 1997). Folglich sind anaerobe Transkriptionsfaktoren, die unterschiedliche Expressionsprofile aufweisen, wahrscheinlich in diverse Kontrollprozesse involviert (Klok *et al.*, 2002). Ihre Bedeutung für die Signaltransduktion unter hypoxischen oder anaeroben Bedingungen muss jedoch noch untersucht werden. Mit dem sauerstoffabhängigen Wechsel der induzierten bzw. reprimierten Transkriptionsfaktoren ist auch eine Umstellung in der Expression anderer Komponenten der Signaltransduktion, wie z.B. von Kinasen und des Ethylenrezeptors ETR2, assoziiert. Änderungen in der cytosolischen Ca^{2+} - (Subbaiah *et al.*, 1994), der ABA- (Kato-Noguchi, 2000) und der Ethylen-Konzentration (Peng *et al.*, 2001) deuten auf eine Beteiligung an der Signaltransduktion, die nachfolgend zu Umstellungen in der Genexpression führt, hin. So stellt die Interaktion von G-Box Bindungsfaktoren (GBF) mit 14-3-3 Proteinen, die sowohl Ca^{2+} binden können als auch die Fähigkeit zur Phosphorylierung besitzen (de Vetten und Ferl, 1995), eine mögliche Verbindung zwischen anaerober Genexpression und Ca^{2+} -Signaltransduktion her.

1.6 Anaerobe Stoffwechsel-Umstellungen

Die energetische Ausbeute aus der Veratmung eines Moleküls Hexose beträgt 39 Moleküle ATP, während die Fermentation lediglich 3 Moleküle ATP hervorbringt. Diese Gegenüberstellung verdeutlicht, dass die ineffiziente ATP-Produktion unter anaeroben Bedingungen eine Umstellung des Stoffwechsels erforderlich macht.

Um sowohl den ATP- als auch den Sauerstoffverbrauch bei reduzierter O_2 -Verfügbarkeit zu verringern, erfolgt eine umfassende Suppression biosynthetischer Aktivitäten (Abb.1). So führen sukzessiv abnehmende O_2 -Konzentrationen von 21 bis 0% innerhalb von 2 Stunden zu fortschreitender Inhibierung der Biosynthese von Saccharose, Aminosäuren, Proteinen und Lipiden (Geigenberger *et al.*, 2000). Unter hypoxischen Bedingungen wird z.B. die Saccharose Degradation im Vergleich zur optimalen O_2 -Versorgung um die Hälfte reduziert, wobei die Degradation bei 0% O_2 wegen der fortschreitenden Fermentation wieder ansteigt (Germain *et al.*, 1987). Interessanterweise bleibt die Stärkesyntheserate mit einem Optimum bei 12% O_2 relativ hoch (Geigenberger *et al.*, 2000). Aufgrund der geringen ATP-Konzentration ist die ADP-Glucosepyrophosphorylase Aktivität, die den ersten Schritt der Stärkesynthese katalysiert, limitiert (Loef *et al.*, 2001).

Da bei O₂-Mangel jedoch die Glykolyse herunterreguliert ist, steigt die 3-Phosphoglyceratkonzentration an (Geigenberger *et al.*, 2000). Dadurch, dass 3-Phosphoglycerat als allosterischer Aktivator der ADP-Glucosepyrophosphorylase wirkt, wird die Limitierung der ADP-Glucosepyrophosphorylase Aktivität kompensiert.

Eine Strategie, um Metabolismus einzuschränken, stellt die Umstellung auf Stoffwechselwege dar, die weniger ATP verbrauchen und Sauerstoff effizienter nutzen (Abb. 1). Zum Beispiel besitzen Pflanzen zwei alternative biochemische Stoffwechselwege, die Saccharose zu Hexosephosphaten abbauen und sich in ihrem Energiebedarf unterscheiden. Die Degradation eines Moleküls Saccharose durch Invertase und Hexokinase benötigt zwei Moleküle ATP, während der Saccharoseabbau durch Sucrosesynthase (SuSy) und UDP-Glucose Pyrophosphorylase nur ein Molekül anorganischen Pyrophosphats (PPi) erfordert (Stitt, 1998). Folglich ist der Energiebedarf des SuSy Stoffwechselweges geringer. Außerdem wird PPi recycelt, das als Abfallprodukt bei vielen biosynthetischen Reaktionen entsteht. In Mais, Kartoffel und Arabidopsis konnte gezeigt werden, dass die Expression der SuSy Gene bei wenig O₂ hochreguliert wird (Zeng *et al.*, 1998 und 1999; Klok *et al.*, 2002), während Invertase Gene stark reprimiert sind (Zeng *et al.*, 1998 und 1999; Abb. 1).

Durch Microarray Analyse wurden unter O₂-Defizit induzierte Gene identifiziert, die auch bislang für die anaerobe Antwort unbekannte Enzyme und Signaltransduktionskomponenten codieren (Klok *et al.*, 2002). Desweiteren belegen diese Expressionsanalysen eine erhöhte Transkription von Genen, die in die alkoholische und Milchsäure-Fermentation involviert sind, wenn die O₂-Konzentration auf 5% abfällt (Abb. 1). Im Gegensatz zur schnellen Induktion der mRNAs der Alkoholdehydrogenase (ADH) und der Lactatdehydrogenase (LDH) wird kein deutlicher Anstieg der Transkriptmengen glykolytischer Enzyme bei 5% O₂ detektiert, was der unterdrückten Glykolyse und Respiration unter diesen hypoxischen Bedingungen entspricht. Daher kann die Induktion dieser ANPs als Prä-Adaption interpretiert werden, damit die Energieproduktion während der anschließenden Anaerobiose gewährleistet ist. Weitere prominente Genen, die adaptive Funktionen ausüben, sind solche, die für Enzyme der Detoxifikation reaktiver Sauerstoffspezies codieren (Klok *et al.*, 2002) und somit eine Rolle beim Schutz vor anoxischen sowie post-anoxischen Schädigungen spielen könnten (Drew, 1997; Abb. 1). Erneuter Eintritt von O₂ in anaerobes Gewebe führt zur Bildung gefährlicher Sauerstoffradikale und anderer toxischer Stoffwechselprodukte, die dann eine oxidative Schädigung der Pflanze verursachen. Im Gegensatz dazu sind die kurzzeitig induzierten Gene der Glutamat Decarboxylase und Alanin Aminotransferase für die Synthese von 4-Aminobuttersäure und Alanin verantwortlich, die der cytosolischen Ansäuerung während Anaerobiose entgegenwirken (Shelp *et al.*, 1999; Menegus, F. *et al.*, 1989; Gout, E. *et*

al., 2001; Abb. 1). Die Transkription von Genen, die in die Ethylensynthese, die Ethylensignaltransduktion, den programmierten Zelltod und den Zellwandabbau involviert sind, wird durch geringe O₂-Konzentrationen induziert (Klok *et al.*, 2002; Olson *et al.*, 1995). Ethylen ist eine Komponente der Signalkaskade, die zu Zelltod und zur Bildung von lysogenem Aerenchym im Wurzelcortex führt (Drew, 2000; Abb. 1). Außerdem wurde ein gesteigertes Expressionslevel für Gene des Stickstoffmetabolismus und der Photorespiration detektiert, die Substrate für die Lipidbiosynthese zur Verfügung stellen (Klok *et al.*, 2002). Viele der anaerob-induzierten Gene spielen auch in der Antwort auf andere biotische und abiotischen Stressfaktoren eine Rolle (Chen *et al.*, 2002; Seki *et al.*, 2001).

Durch Inhibierung der Respiration und Biosynthese sollen anaerobe Bedingungen möglichst verhindert werden (Abb. 1). In Arabidopsiswurzeln sind unter O₂-Mangel diverse Gene reprimiert, die die Enzyme der Zellwand-, Lipid- und Flavanoid-Biosynthese sowie der Pathogenabwehr codieren (Klok *et al.*, 2002). Da der Abbau von Proteinen ein ATP-verbrauchender Prozeß ist, werden auch Gene der Proteindegradation infolge von O₂-Mangel reprimiert (Klok *et al.*, 2002). Die Transkriptmengen eines bZIP Transkriptionsfaktors, der in die Zucker-induzierte Antwort involviert ist, einer Plasmamembran-ATPase und eines Triose-Phosphat Translokators sind ebenfalls reduziert (Menegus *et al.*, 1989).

1.7 Zellschädigung durch cytoplasmatische Ansäuerung

Schädigung und Zelltod, der nicht der Anoxia-Toleranz durch Aerenchym-Bildung dient, resultieren vermutlich aus toxischen Endprodukten des anaeroben Stoffwechsels, einem verringerten Energiemetabolismus oder fehlenden Substraten für die Respiration (Drew, 1997). Außerdem scheint die Regulation des cytoplasmatischen pH-Wertes von großer Bedeutung für die Zellvitalität zu sein (Roberts *et al.*, 1984; Abb. 1). Aufgrund der Milchsäure-Bildung bei Anaerobiose fällt nämlich der pH-Wert im Cytoplasma ab. Da ein Großteil des gebildeten Lactats jedoch aus der Zelle heraustransportiert wird, erfolgt kein weiterer Rückgang des cytosolischen pH-Wertes, sondern es stellt sich ein konstanter pH-Wert ein. Offensichtlich wird in Folge dieses sauren pH-Wertes die Lactatdehydrogenase (LDH) inhibiert und die Pyruvatdecarboxylase (PDC) aktiviert, was zu einer Umstellung von der Milchsäure-Gärung zur bevorzugten alkoholischen Fermentation führt (Drew, 1997). Dadurch, dass Ethanol im Lipid-Bilayer löslich ist, kann es leicht aus Geweben herausdiffundieren, und stellt somit keinen kritischen Faktor für das Überleben von Zellen unter anaeroben Bedingungen dar (Drew, 1997). Bei saurem pH-Wert schließt sich eine zweite Phase der cytoplasmatischen Ansäuerung an, die aus

einem Protonenverlust der Vakuole resultiert und zu Zelltod führt. Unter normoxischen Bedingungen sorgen ATPasen für die Aufrechterhaltung eines Protonengradienten zwischen Tonoplast und Vakuole. Steht aber aufgrund des fehlenden O₂ weniger Energie zur Verfügung, ist die Aktivität der Protonenpumpen beeinträchtigt, und es kommt zu einem passiven H⁺-Rückfluss ins Cytoplasma (Drew, 1997).

Andererseits stellt der niedrige cytoplasmatische pH-Wert eine Voraussetzung für einige wichtige Stoffwechselumstellungen unter Anaerobiose dar. Die Succinat-Synthese und die Decarboxylierung von Glutamat zu GABA basieren z.B. auf Protonen verbrauchenden Prozessen (Menegus *et al.*, 1989). Außerdem könnte ein saurer pH-Wert dazu führen, dass Pyrophosphat (PPi) als Energiequelle im Vergleich zu ATP bevorzugt wird. Denn niedrige pH-Werte erhöhen die freie Energie der PPi-Hydrolyse, während die Energieausbeute aus ATP-Hydrolyse verringert wird (Davies *et al.*, 1993).

1.8 Morphologische Anpassung an sauerstoffarme Bedingungen

In Stengeln und Wurzeln aquatischer und überflutungstoleranter Pflanzen kommt es durch Zellseparation während der Entwicklung (Schizogenie) oder durch Zelltod (Lysogenie) zur Bildung von aerenchymatischem Gewebe. Die Fähigkeit lysogenes Aerenchym zu bilden ist auch bei Pflanzen trockener Standorte weit verbreitet und wird, insbesondere bei verminderter O₂-Versorgung, induziert. Zusätzlich dient z.B. in Kartoffelknollen die Ausbildung von Lentizellen der O₂-Versorgung (Abb. 1). In Wurzeln ohne Aerenchym ist der Widerstand für Sauerstoffbewegung in den gasgefüllten Interzellularräumen relativ groß. Deshalb ist für die Sauerstoffversorgung über weitere Strecken aerenchymatisches Gewebe notwendig und effektiv, weil es die metabolische Aktivität in Geweben unterbindet und dadurch die O₂-Versorgung verbessert (van Dongen *et al.*, 2003; Drew *et al.*, 2000). Dann ist die Anzahl O₂-verbrauchender Zellen und die Respirationsrate pro Volumeneinheit Gewebe reduziert und der Widerstand für die Gasdiffusion oder Konvektion ist geringer. Die Bildung von Aerenchym stellt also eine langfristige adaptive Antwort auf O₂-Mangel dar. Dennoch wird auch in Pflanzen mit aerenchymatischen Wurzeln aufgrund eines erniedrigten Energiemetabolismus und gesteigerter Produktion von Ethanol, Alanin sowie Lactat eine begrenzte Sauerstoffversorgung festgestellt (Gibbs *et al.*, 1995).

In hypoxischen Maiswurzeln, in denen eine höhere Ethylenkonzentration als in normoxischen Wurzeln vorliegt, wird die Ausbildung lysogenen Aerenchyms induziert (Drew *et al.*, 2000). Außerdem wird die Aktivität einer Ca²⁺-abhängige Cellulase, die für die Zellyse verantwortlich ist, durch Ethylen stimuliert (He *et al.*, 1996). Basierend auf diesen Beobachtung wird eine Hypoxia stimulierte Ethylen Biosynthese und eine

anschließende Ethylen-vermittelte Signaltransduktion, die den Zelltod und die Aerenchymbildung bei O₂-Mangel auslöst, postuliert (Drew *et al.*, 2000). Durch Reagenzien, die G-Proteine aktivieren, cytosolische Ca²⁺ Konzentration steigern oder Proteinphosphatasen inhibieren, ist es möglich, Zelltod im Cortex normoxischer und hypoxischer Wurzeln auszulösen. Folglich spielen G-Proteine, die cytosolische Ca²⁺-Konzentration sowie Proteinkinasen vermutlich eine Rolle in der Ethylen-assoziierten Signaltransduktion (Drew *et al.*, 2000). Außerdem wurde entdeckt, dass die Transkriptmenge der Phospholipase D (PLD) sowie ihre enzymatische Aktivität früh in der Aerenchymbildung durch Hypoxia gefördert wird (Drew, 1997).

Unter anaeroben Bedingungen wird keine Zellyse und Aerenchymbildung durch Ethylen induziert, weil der für die Ethylensynthese erforderliche Sauerstoff fehlt (Bleecker und Kende, 2000). Obwohl die Ca²⁺-Konzentration auch die Signaltransduktion in anaeroben Wurzeln beeinflusst, sind die Konsequenzen in hypoxischen und anaeroben Zellen weitgehend unterschiedlich. Während eine gesteigerte Ca²⁺-Konzentration im Allgemeinen zur Akklimationisierung und somit zu einer Verlängerung der Lebensfähigkeit anaerober Zellen führt, trägt sie in hypoxischen Geweben zum Zelltod bei (Drew, 1997). Im Zusammenhang mit anaerob induziertem Zelltod in Maiswurzelspitzen wurde eine Ca²⁺-abhängige Cysteinprotease identifiziert (Subbaiah *et al.*, 2000). In Folge des Abschneidens der Wurzelspitzen vor anaerober Behandlung wurde eine geringere Wurzelschädigung und eine verstärkte Ausbildung von Lateralwurzeln festgestellt. Insofern vermittelt der anaerobe Wurzelspitzentod möglicherweise einen adaptiven Vorteil und trägt zu verbessertem Überleben unter Anaerobiose bei (Subbaiah *et al.*, 2000).

Eine andere Form der morphologischen Antwort auf Überflutung ist das hyponastische Wachstum von Pflanzen (Cox *et al.*, 2003). Innerhalb weniger Stunden richtet *Rumex palustris* seine Blätter vertikal auf und bringt durch Elongation seiner jüngsten Petiolen seine vitalen Organe über die Wasseroberfläche. Die Folge ist eine Umstellung des Metabolismus von anaerob auf aerob, so dass die Pflanze langfristig Überflutung überleben kann.

1.9 Hypoxische Akklimationisierung an Anaerobiose

Unter natürlichen Bedingungen ist es relativ unwahrscheinlich, dass Wurzeln plötzlich anaeroben Bedingungen ausgesetzt sind. Eine graduelle Umstellung von Normoxia über Hypoxia zu Anaerobiose ermöglicht eine Akklimationisierung der Pflanze (Ellis *et al.*, 1999; Germain *et al.*, 1997). Dann ist die Pflanze in der Lage nachfolgend anaeroben Bedingungen eine höhere Toleranz entgegenzusetzen. Zum Beispiel scheint Hypoxia

durch frühe Expression anaerober Gene, die Enzyme der alkoholischen Fermentation und der Milchsäuregärung codieren, Adaption zu vermitteln (Klok *et al.*, 2002; Geigenberger, 2003). Dadurch wird die Energieproduktion auch bei anschließender Anaerobiose gewährleistet. Die Transkriptmengen der erforderlichen Enzyme steigen unter hypoxischen Bedingungen an und gehen bei Übergang zu anaeroben Bedingungen nur langsam zurück (Andrew *et al.*, 1994), während sie in anaeroben, nicht akklimatisierten Wurzeln zwar gebildet, aber relativ schnell wieder abgebaut werden (Drew, 1997). Andere Hypoxia-induzierte Gene codieren u.a. Glutamat Decarboxylase und Alanin Aminotransferase, die wahrscheinlich der cytosolischen Ansäuerung entgegenwirken (Gout *et al.*, 2001). Außerdem findet in akklimatisierten Wurzeln ein verbesserter Lactattransport aus dem Cytoplasma in die externe Umgebung statt, wodurch die cytoplasmatische Ansäuerung zusätzlich eingeschränkt wird (Rivoal und Hanson, 1994). Von 10 untersuchten Enzymen der Glykolyse und Fermentation zeigt lediglich die Glucokinase eine reduzierte Aktivität bei erniedrigtem pH-Wert und Inhibition bei geringem ATP/ADP Verhältnis. Daher könnte der Glucokinase-Aktivität eine Schlüsselrolle bei der hypoxischen Akklimatisierung zukommen (Bouny und Saglio, 1996).

1.10 Ziele dieser Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es, einen Beitrag zur Aufklärung der komplexen Stress-Antwort von Pflanzen auf anaerobe Umgebungsbedingungen zu leisten. Die vorliegende Arbeit wurde im Rahmen eines Forschungsprojektes mit agrarbiotechnologischem Schwerpunkt erstellt. Daher konzentrieren sich die Untersuchungen auf Tomate (*Lycopersicon esculentum*), die nah mit der Kartoffel (*Solanum tuberosum*) als wirtschaftlich relevanter Nutzpflanze verwandt ist und deren Genotyp Micro-Tom günstige Modell-Eigenschaften besitzt. Da zahlreiche Adaptionsmechanismen der Pflanzen bei Anaerobiose auf eine Umstellung der Genexpression zurückzuführen sind, sind anaerob-spezifische Transkriptionsfaktoren als Komponenten der Genregulation besonders interessant. Während einige Transkriptionsaktivatoren isoliert und analysiert wurden, die in die anaerobe Signaltransduktion involviert sind, ist nur wenig über die transkriptionelle Repression bei Sauerstoffmangel bekannt. Deshalb wurde einerseits ein NAC Transkriptionsfaktor und andererseits ein potentiell reprimierend wirkender bZIP Faktor funktionell untersucht.

Basierend auf den Erkenntnissen, welche Reaktionen und Mechanismen in höheren Pflanzen unter Anaerobiose ablaufen, könnten Strategien entwickelt werden, um Nutzpflanzen eine erhöhte Toleranz gegenüber abiotischem Sauerstoff-Stress zu verleihen.

2. Material und Methoden

2.1 Chemikalien

Alle nicht näher erläuterten Chemikalien wurden von den Firmen BD Biosciences, Bio-Rad, Biozym, Duchefa, Fluka, Merck, Serva, Sigma, Pharmacia Biotech, Riedel De Haen und Roth bezogen. Medien bzw. Lösungen wurden, sofern nicht anders beschrieben, mit deionisiertem bzw. doppelt destilliertem Wasser angesetzt.

2.2 Filtermaterialien und Membranen

BioTrace™ NT 0,45 µm Pure Nitrocellulose Transfer Membran, 82 mm discs	PALL GelmanSciences
Hybond-N Nylonmembran	Pharmacia Biotech
Microcon YM-10	Millipore
Ni-NTA Agarose	Qiagen, Invitrogen
Sephadex® G-50 Medium	Pharmacia Biotech

2.3 Radiochemikalien

[α - ³² P]-dCTP, 3000Ci/mmol	Hartmann Analytic
---	-------------------

2.4 Autoradio- und Fotografiematerialien

Röntgenfilme X-OMAT AR, Kodak	Pharmacia Biotech
Röntgenfilme Hyperfilm™ MP	Pharmacia Biotech

2.5 Enzymsysteme und Reagenzsätze (Kits)

Alle eingesetzten Restriktionsendonucleasen und DNA modifizierenden Enzyme (CIAP, Klenow-Fragment, T4 DNA Ligase, T4 DNA Polymerase) wurden, sofern nicht gesondert beschrieben, von der Firma MBI Fermentas bezogen.

Nachfolgend sind die verwendeten Kits mit Herstellerangabe und Katalognummer aufgeführt:

Kit	Hersteller	Kat. No.
NucleoSpin® Plasmid	Macherey-Nagel	740588.250
NucleoSpin® Extract	Macherey-Nagel	740590.250
NucleoBond® AX-100	Macherey-Nagel	740573.100
SuperScript™ Plasmid System for cDNA Synthesis and Plasmid Cloning with Gateway® Technology	Invitrogen	18248-013
ElectroMAX™ DH10B™ Competent Cells	Invitrogen	19625-011
TA Cloning® Kit	Invitrogen	K2000-J10
AutoRead™ Sequencing Kit	Pharmacia Biotech	27-2690-02
Anaerocult	Merck	1.13829
CLONTECH PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit	Clontech	K1804-1
MATCHMAKER Library Construction & Screening Kit	Clontech	K1615-1
QIAquick®PCR Purification Kit	Qiagen	28106
Oligotex™ mRNA Midi Kit	Qiagen	70042
HexaLabel™ DNA Labeling Kit	MBI Fermentas	70042
QIAprep®Spin Miniprep Kit	Qiagen	27106
QIAquick®Gel Extraction Kit	Qiagen	28704
BL21-CodonPlus® Competent Cells	Stratagene	230245

2.6 Verwendete Bakterien- und Hefestämme

<i>Escherichia coli</i>	Genotyp	Referenz
BL21-CodonPlus® (DE3)-RIL	<i>E. coli</i> B F ⁻ <i>ompT hsdS</i> (rB ⁻ mB ⁻) <i>dcm⁺ tet^r</i> <i>gal</i> λ(DE3) <i>endA Hte</i> [<i>argU ileY leuW Cam^r</i>]	Invitrogen
DH10B™	F ⁻ <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) φ80d/ <i>lacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacX74 deoR recA1 endA1 araD139</i> Δ(<i>ara</i> <i>leu</i>)7697 <i>galU galK</i> λ ⁻ <i>rpsL nupG</i>	Invitrogen
INVαF ⁺	F ⁺ <i>endA1 recA1 hsdR17</i> (r _k ⁻ , m _k ⁺) <i>supE44 thi-1</i> <i>gyrA96 relA1</i> φ80/ <i>lacZ</i> ΔM15 Δ(<i>lacZYA-argF</i>) <i>U169</i> λ ⁻	Invitrogen
M15[pREP4]	<i>nal^s str^s rif^s thi⁻ lac⁻ ara⁺ gal⁺ mtl⁻</i> F ⁻ <i>recA⁺ uvr⁺</i> <i>lon⁺ kan^r lac^h</i>	Qiagen
XL1-Blue MRF ⁺	<i>supE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA46 thi relA1</i> <i>lacF⁺</i> [<i>proAB⁺ lac^h lacZ</i> ΔM15 Tn 10(<i>tet^r</i>)]	Stratagene

<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Genotyp	Referenz
AH109	<i>MATa trp1-901 leu2-3 112 ura3-52 his3-200</i> <i>gal4Δ gal80Δ LYS2::GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-HIS3,</i> <i>MEL1, GAL2_{UAS}-GAL2_{TATA}-ADE2,</i> <i>URA3::MEL1_{UAS}-MEL1_{TATA}-lacZ</i>	Clontech

2.7 Verwendete Pflanzenlinien

Lycopersicon esculentum cultivar Micro-Tom (Meissner *et al.*, 1997)

Nicotiana tabacum cultivar Petit Havanna SRI (Maliga *et al.*, 1975)

2.8 Verwendete Plasmide

Plasmid	Beschreibung	Referenz
pCR®2.1	TA Klonierungsvektor	Invitrogen
pBluescript SK+	Klonierungsvektor	Stratagene
pRT103-GUS	CaMV 35S:: <i>uidA</i>	Töpfer <i>et al.</i> (1988)
pVKH-35S-pA1	T-DNA Vektor	Reintanz (1997); Klaus Palme, MDL Köln; pers. Mitteilung
pQE-30	<i>E. coli</i> Expressionsvektor	Qiagen
pSport1	cDNA-Bank Vektor	Invitrogen
pGBKT7	DNA-BD Vektor (Bait)	Clontech
pGBKT7-53	DNA-BD Positivkontrollvektor	Clontech
pGBKT7-Lam	DNA-BD Negativkontrollvektor	Clontech
pGADT7	AD Vektor (Prey)	Clontech
pGADT7-T	AD Kontrollvektor	Clontech
pGADT7-Rec	<i>Sma</i> I-linearisierter AD Vektor (Prey)	Clontech
pCL1	Positivkontrollvektor für β-Gal Test	Clontech
pBT10-TATA-GUS	TATA:: <i>uidA</i>	Sprenger-Haussels und Weisshaar (2000)
pRT101-LUC	CaMV 35S:: <i>luc</i>	Töpfer <i>et al.</i> (1988)
pC1L-1097	C1:: <i>luc</i>	Dietmar Stahl, Planta GmbH Einbeck; pers. Mitteilung
pUK4030	Binärer Vektor; <i>GapC4</i> :: <i>uidA</i>	Köhler <i>et al.</i> (1996)
pOCA28-35S-GUS	Binärer Vektor; CaMV 35S:: <i>uidA</i>	Bülow <i>et al.</i> (1999)

2.9 Molekularbiologische Techniken

Allgemeine molekularbiologische Methoden (Screening von cDNA-Banken, Kultivierungsbedingungen für *E. coli*, Herstellung kompetenter *E. coli* Zellen, Hitzeschocktransformation von *E. coli* Zellen, Plasmidisolierung aus *E. coli*, Gelelektrophorese und Southern Blot) wurden nach Standardprotokollen von Sambrook *et al.* (1989) durchgeführt.

Restriktionsansätze und DNA Modifikationen wie Dephosphorylierung, Generierung von glatten Enden sowie Ligationen erfolgten entsprechend den Hersteller-Hinweisen der eingesetzten Enzyme.

Bei der Verwendung von Kits (DNA-Extraktion aus Agarosegelen, Aufreinigung von PCR-Produkten, Plasmidpräparationen aus *E. coli*, radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten, ALF-Sequenzreaktionen) wurde nach Hersteller-Protokollen verfahren. Außerdem wurden Sequenzierungen mittels Cycle Sequencing entsprechend der Didesoxy Methode nach Sanger *et al.* (1977) extern bei SeqLab (Göttingen) durchgeführt.

2.10 Arbeiten mit Ribonucleinsäure

2.10.1 Extraktion von Gesamt-RNA aus Pflanzenmaterial

Die RNA Isolierung aus pflanzlichem Gewebe erfolgte entsprechend einem Protokoll von Meyer-Gauen *et al.* (1998).

Alle im Folgenden eingesetzten wässrigen Lösungen zur RNA Isolierung wurden mit 0,1% (v/v) DEPC versetzt, kräftig durchmischt und nach ca. 16 Stunden autoklaviert. Den Puffern wurde RNase freies Tris-HCl erst nach der DEPC-Behandlung zugesetzt, um eine kovalente Bindung des DEPC an primäre und sekundäre Amine zu vermeiden und so ihre Pufferwirkung zu gewährleisten.

Das Pflanzenmaterial wurde durch Mörsern unter flüssigem Stickstoff aufgeschlossen und im 5-fachen Volumen, bezogen auf die Materialeinwaage, an 65 °C warmem Extraktionspuffer [2% (w/v) CTAB; 100 mM Tris-HCl pH 8,0; 25 mM EDTA pH 8,0; 2 M NaCl; 8% (w/v) Polyclar AT; 2% (v/v) 0,14 M β -Mercaptoethanol] homogenisiert. Durch eine 5-minütige Zentrifugation bei 5500xg und 4 °C wurden Zelltrümmer und Polyphenole pelletiert. Proteine wurden durch zweimalige Extraktion des Überstandes mit jeweils einem Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) und 10-minütige Zentrifugation bei 6500xg und 4 °C denaturiert und entfernt. Nach langsamer Zugabe des 0,25-fachen Volumens an Ethanol und Extraktion mit einem Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) wurde erneut bei 6500xg und 4 °C zentrifugiert. Die RNA wurde durch den Zusatz von einem 0,25-fachen Volumen an 10 M LiCl zum

Überstand über Nacht bei 0 °C präzipitiert. Durch eine 30-minütige Zentrifugation bei 6500xg und 4 °C wurde die RNA pelletiert, im 0,25-fachen Volumen der ursprünglichen Pflanzenmaterialeinwaage an 50 °C warmem SSE-Puffer [1 M NaCl; 0,5% (v/v) SDS; 10 mM Tris-HCl pH 8,0; 1 mM EDTA pH 8,0] resuspendiert und erneut durch Zugabe des 2-fachen Volumens an Ethanol zwei Stunden bei -20 °C präzipitiert. Abschließend wurde die RNA 40 Minuten bei 38000xg und 4 °C pelletiert, mit 70%igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in ddH₂O aufgenommen. Die Lagerung der RNA erfolgte bei -80 °C.

2.10.2 PolyA+ mRNA Isolierung

Für die Isolierung von PolyA+ mRNA wurde 1 mg Gesamt-RNA unter Verwendung des „Oligotex™ mRNA Midi Kits“ von Qiagen eingesetzt. Die Durchführung der PolyA+ mRNA Aufreinigung erfolgte gemäß dem Herstellerprotokoll. Die Ausbeute an isolierter PolyA+ mRNA betrug 5 µg.

2.10.3 Konzentrationsbestimmung von RNA

Die Konzentration isolierter RNA wurde bei einer Wellenlänge von 260 nm gegen eine Nullwertprobe photometrisch bestimmt (Ultrospec 2000, Pharmacia Biotech). Dabei entspricht 1 OD einer RNA-Konzentration von 40 µg/ml. Um Verunreinigungen der RNA mit Polysacchariden bzw. Proteinen beurteilen zu können, wurde ein Extinktionsverhältnis von 230 nm zu 260 nm zu 280 nm erstellt, das bei sauberer RNA 1:2:1 betragen sollte.

2.10.4 Northern Blot Analyse

10 µg Gesamt-RNA wurden mit einem Volumen 2x RNA-Ladepuffer [197 µl deion. Formamid; 64 µl Formaldehyd; 39 µl 20x RNA-Borat-Puffer; 0,4 mg Bromphenolblau; 0,4 mg Xylencyanol; 2 µl Ethidiumbromid (c=10) ad 390 µl ddH₂O_{DEPC}] versetzt, 10 Minuten bei 70 °C denaturiert und in einem 0,8-1%igen Formaldehyd-Agarosegel [0,8-1% (w/v) Agarose; 5 ml 20x RNA-Borat-Puffer; 16,7 ml 37%iges Formaldehyd; ddH₂O_{DEPC} ad 100 ml] aufgetrennt. Als Laufpuffer wurde 1x RNA-Borat-Puffer [20x RNA-Borat-Puffer: 0,06M Tetraborat; 0,6 M Borat; 4 mM EDTA pH 8,0] eingesetzt. Der Transfer der RNA auf Nylonmembran erfolgte nach dem Standardprotokoll von Sambrook *et al.* (1989), wobei als Blotpuffer 20x SSC [2 M NaCl; 12 M NaOC₂H₅] verwendet wurde. Die gebloottete RNA wurde durch 2-stündiges Backen der Membran bei 80 °C fixiert.

Die Vorhybridisierung der Northern Blot Membranen erfolgte 3-6 Stunden bei 65 °C in Church-Puffer [0,25 M NaPO₄-Puffer pH 7; 0,7% (v/v) SDS; 50 µg/ml Heringssperma-DNA]. Nach Zugabe der entsprechenden radioaktiv markierten Sonde wurde über Nacht bei 65 °C hybridisiert. Anschließend wurden die Membranen je 15 Minuten bei 65 °C mit vier Waschlösungen ansteigender Stringenz (4x SSC/0,1% SDS; 2x SSC/0,1% SDS; 1x SSC/0,1% SDS; 0,5x SSC/0,1% SDS) gewaschen und mit Röntgenfilm bei -80 °C unter Verwendung einer Verstärkerfolie exponiert.

Die Hybridisierungssonden wurden unter Verwendung des „HexaLabel™ DNA Labeling Kits“ von MBI Fermentas gemäß dem Herstellerprotokoll mit jeweils 9 pmol [α -³²P]-dCTP radioaktiv markiert. Über eine Sephadex® G-50 Säule wurden nicht inkorporierte Nucleotide vom markierten DNA Fragment abgetrennt.

2.11 Suppression Subtractive Hybridization (SSH)

Die subtraktive Hybridisierung nach Diatschenko *et al.* (1996) ist eine Methode, die den Vergleich zweier mRNA Populationen ermöglicht. Diese Technik wurde eingesetzt, um Gene zu identifizieren, die unter anaeroben, jedoch nicht unter aeroben Bedingungen induziert, d.h. differentiell exprimiert werden. Die cDNA Fragmente solcher anaerob induzierter Gene wurden durch die sog. Forward Subtraktion isoliert, während durch die Reverse Subtraktion ausschließlich bzw. stärker aerob exprimierte cDNA Fragmente angereichert wurden.

Zunächst wurde die cDNA Synthese sowie die anschließende subtraktive Hybridisierung unter Verwendung des „CLONTECH PCR-Select™ cDNA Subtraction Kits“ der Firma Clontech entsprechend dem Benutzerhandbuch (PT1117-1) durchgeführt. Für jede Synthese wurden 2 µg PolyA⁺ mRNA aus Tomatenpflanzen (*Lycopersicon esculentum* cv. Micro-Tom), inklusive Blättern, Früchten und Wurzeln, eingesetzt. Die PolyA⁺ mRNA wurde einerseits aus Pflanzenmaterial, das unter aeroben Bedingungen gehalten worden war, und andererseits aus Pflanzen, die 20 Stunden lang in einem luftdichten Plexiglascontainer (Merck) zusammen mit Anaerocult A (Merck) anaerob inkubiert worden waren, isoliert (Kapitel 2.10.2).

Die cDNA Fragmente der Forward und Reverse Subtraktion wurden nach Zusatz von je 0,5 µl dATP (10 mM) und Taq-Polymerase (5U/µl, Qbiogene) eine Stunde bei 72 °C inkubiert, um an den 3' Enden der PCR-Produkte jeweils ein Adenosin anzuhängen. 30 ng der amplifizierten und modifizierten cDNA Fragmente wurden in den Plasmidvektor pCR®2.1 kloniert. Dazu wurde der TA Cloning® Kit von Invitrogen entsprechend dem Herstellerprotokoll eingesetzt.

Die subklonierten cDNA Fragmente der Forward Subtraktion wurden mit *Rsa* I gespalten, die Duplikagele der Restriktionsansätze geblottet und die Southern Blot Membranen mit den forward bzw. reverse subtrahierten PCR-Produkten bei 60 °C hybridisiert. Dabei erfolgte die radioaktive Markierung der PCR-Produkte, die Abtrennung der nicht inkorporierten Nucleotide, die Hybridisierung und das Waschen der Filter wie in Kapitel 2.10.4 dargestellt.

2.12 cDNA Bank Synthese

Für die Herstellung einer anaeroben cDNA Bank aus Tomate wurde das „SuperScript™ Plasmid System with Gateway® Technology for cDNA Synthesis and Cloning“ (Invitrogen) verwendet. Die Durchführung entsprach dem Protokoll des Herstellers.

5 µg PolyA+ mRNA aus 20 Stunden anaerob induziertem Pflanzengewebe (Kapitel 2.11) wurden für die cDNA Synthese eingesetzt. Lediglich cDNAs von mehr als 500 bp Größe wurden direktionell in den Vektor pSport1 kloniert. Die Transformation in „ElectroMAX™ DH10B™ Competent Cells“ (Invitrogen) erfolgte durch Elektroporation. Die Anzahl der Primärklone der synthetisierten cDNA Bank betrug 5×10^5 cfu/ml. Das Screening nach vollständigen cDNA Klonen erfolgte nach Sambrook *et al.* (1989). Als Sonden wurden die entsprechenden cDNA Fragmente, die durch SSH isoliert und identifiziert werden konnten, eingesetzt.

2.12.1 Elektrotransformation der cDNA Bank in *Escherichia coli*

Die Transformation von DNA durch Elektroporation erfordert besonders salzarme Bedingungen. Daher wurden die Ligationsansätze zunächst einer Phenol/Chloroform Extraktion unterzogen, die DNA mit Ethanol präzipitiert, anschließend dreimal mit 70%igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in ddH₂O resuspendiert.

In vorgekühlten Elektroporationsküvetten (peqlab) wurden 25 µl elektrokompetente Zellen (DH10B™, Invitrogen) mit 1 µl (~ 100 ng) DNA vermischt und fünf Minuten auf Eis inkubiert. Die Elektroporation erfolgte bei 2,5 kV, 25 µF und 200 Ohm im Gene Pulser von Bio-Rad, wobei die Zeitkonstante für einen Impuls 4,8 bis 5 Millisekunden betragen sollte. Nach sofortiger Zugabe von 1 ml SOC-Medium [2% (w/v) Bactotrypton; 0,5% (w/v) Hefeextrakt; 10 mM NaCl; 2,5 mM KCl; 10 mM MgCl₂; 10 mM MgSO₄; pH 6,8-7,0] wurde der Transformationsansatz eine Stunde bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. 200 µl des Transformationsansatzes wurden auf entsprechendem LB-Selektionsmedium (10 g Bactotrypton; 5 g Hefeextrakt; 10 g NaCl; 2,4 g MgSO₄*7H₂O; 14 g Agar ad 1000 ml deion. H₂O; supplementiert z.B. mit 100 µg/ml Carbenicillin für pSport1] ausplattiert.

2.13 Rekombinante Proteinexpression und Aufreinigung

2.13.1 Rekombinante Expression anaerob induzierter Proteine aus Tomate

Mit Hilfe des Expressionsvektors pQE-30 von Qiagen, der über einen N-terminalen 6xHis-Tag verfügt, wurden folgende Proteine aus Tomate in *E. coli* nach dem Herstellerprotokoll überexprimiert: ABZ1, ANA sowie zwei ABZ1-Deletionsmutanten (ABZ1₁₋₁₀₀, ABZ1₄₇₋₁₃₈). Zunächst wurden die entsprechenden codierenden Sequenzen durch PCR amplifiziert. Als Template wurden die full-size cDNA Klone von ABZ1 bzw. ANA, die in pSport1 kloniert vorliegen (Kapitel 2.12), eingesetzt.

In Spalte 1 der Tabelle 1 sind die Bezeichnungen der rekombinanten Proteine aufgeführt, Spalte 2 gibt die Bezeichnung des vollständigen cDNA Klons sowie dessen Labor-interne Nummerierung an. Die für die PCR verwendeten Primer, inklusive ihrer Labor-internen DNA-Nr. sowie ihre Sequenzen sind in den Spalten 3 und 4 aufgeführt. Dabei sind genspezifische Sequenzbereiche durch fette Schreibweise und eingebaute Restriktionsschnittstellen durch Unterstreichung kenntlich gemacht.

Tab. 1: Bezeichnungen der in *E. coli* exprimierten Proteine sowie die Bezeichnungen der für die PCR eingesetzten Templates, Primer und Primersequenzen

Protein	Template (DNA-Nr.)	Primer (DNA-Nr.)	Sequenz
ABZ1	pSport1-MT74 (2738)	74/5' Primer (3468)	5'-TATAGGATCC <u>ATGTCACCTTTAAGGCAGAG</u> -3' <i>Bam</i> H
		74/3' Primer (3469)	5'-ATATCCCGGGT <u>TAAAAATTAAACAATCCTG</u> -3' <i>Sma</i> L
ANA	pSport1-MT172 (3091)	MT172/5'Primer (3493)	5'-TATAGGATCC <u>ATGAACAAAGGAGCAAACGG</u> -3' <i>Bam</i> H
		MT172/3'Primer (3494)	5'-ATATGTCGAC <u>TTAGTAAGGTTTTTGCATGTATAGG</u> -3' <i>Sal</i> I
ABZ1 ₁₋₁₀₀	pSport1-MT74 (2738)	74/5' Primer (3468)	5'-TATAGGATCC <u>ATGTCACCTTTAAGGCAGAG</u> -3' <i>Bam</i> H
		ABZ1-Mu1/3' (3936)	5'-ATACCCGGGT <u>TATAATACCTGAGCCTATCAGTC</u> -3' <i>Sma</i> L Stop
ABZ1 ₄₇₋₁₃₈	pSport1-MT74 (2738)	ABZ1-Mu2/5' (3935)	5'-TATGGATCCATGCTTCTGCAAGATTGACAGG-3' <i>Bam</i> H Start
		74/3' Primer (3469)	5'-ATATCCCGGGT <u>TAAAAATTAAACAATCCTG</u> -3' <i>Sma</i> L

Nachfolgend sind die Zusammensetzung der PCR Reaktionen und das verwendete Temperaturprogramm aufgeführt:

1 µl	Template (1 ng/µl)
2 µl	10x Advantage 2 Puffer (Clontech)
1 µl	5'Primer (100 pmol/µl)
1 µl	3'Primer (100 pmol/µl)
1 µl	10 mM dNTP
0,5 µl	5 U/µl Advantage 2 Polymerase Mix (Clontech)
13,5 µl	ddH ₂ O
20 µl	Gesamtvolumen

2 Minuten	94 °C	} 30 Zyklen
30 Sekunden	94 °C	
1 Minute	X °C Annealing	
2 Minuten	72 °C	
10 Minuten	72 °C	

Die Annealingtemperaturen unterschieden sich in Abhängigkeit vom eingesetzten Template und den verwendeten Primern. Die einzelnen Annealingtemperaturen betrugen für ABZ1 und ABZ1₁₋₁₀₀ 55 °C, für ANA 62 °C und für ABZ1₄₇₋₁₃₈ 65 °C.

Die PCR-Produkte wurden in pCR[®]2.1 kloniert (Kapitel 2.11), sequenziert und anschließend über geeignete Restriktionsschnittstellen so in pQE-30 subkloniert, dass ein offenes Leseraster mit dem 6xHis-Tag entstand. In Tabelle 1 sind die eingesetzten Restriktionsendonucleasen, deren Schnittstellen mit den PCR-Primern eingeführt worden waren, aufgeführt. Die Transformation der rekombinanten pQE-30 Plasmide in M15[pREP4] *E. coli* Zellen erfolgte gemäß dem „The QIAexpressionist™“ Handbuch von Qiagen.

Aufgrund eines in *E. coli* selten auftretenden Codons (AGG–Arginin 0,2‰), das mit einer Häufigkeit von 72‰ für die Expression von ABZ1 sowie seiner beiden Deletionsmutanten benötigt wird, mussten diese Proteine in einem anderen *E. coli* Wirtsstamm exprimiert werden. Die entsprechenden rekombinanten pQE-30 Plasmide wurden also zusammen mit dem Repressorplasmid pREP4 in BL21-CodonPlus(DE3)-RIL *E. coli* Zellen (Stratagene) cotransformiert. Dieser Stamm verfügt über das pACYC Plasmid, das eine Resistenz gegen Chloramphenicol vermittelt und zusätzliche Kopien der *argU*, *ileY* und *leuW* tRNA Gene enthält.

Die Induktionsbedingungen für ABZ1, ANA, ABZ1₁₋₁₀₀ und ABZ1₄₇₋₁₃₈ entsprachen den Empfehlungen von Qiagen. 5 ml einer über Nacht Kultur wurden in 100 ml frisches LB-

Medium mit 100 µg/ml Carbenicillin, 50 µg/ml Kanamycin und gegebenenfalls 50 µg/ml Chloramphenicol überimpft. Nach einer ca. 1-stündigen Inkubation bei 37 °C unter Schütteln wurde 1 ml Kultur, die bei 600 nm eine optische Dichte von 0,6 – 0,8 aufweisen sollte, als nicht induzierte Proteinextrakt-Probe zum Zeitpunkt t=0 abgenommen. Die Hauptkultur wurde fünf weitere Stunden mit 1 mM IPTG zur Induktion der Proteinexpression bei 37 °C inkubiert. Die Zellen wurden 20 Minuten bei 4 °C und 2500xg pelletiert, in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bis zur weiteren Verarbeitung bei -20 °C aufbewahrt.

2.13.2 De- und renaturierende Aufreinigung von rekombinantem ABZ1 und ANA

Die Aufreinigung 6xHis-getaggtter Proteine erfolgte über die Ni-NTA Affinitätschromatographie.

ANA, ABZ1 sowie dessen Deletionsmutanten waren unter den gewählten Expressionsbedingungen ausschließlich bzw. überwiegend unlöslich. Daher wurden sie zunächst denaturiert und, nach mehreren Renaturierungsschritten auf der Säule, eluiert. Dazu wurde nach einem modifizierten Protokoll von Schmitz und Baeuerle (1997) verfahren. Die Zellyse erfolgte in 5 ml des stark denaturierenden Puffers A (100 mM NaH₂PO₄; 10 mM Tris-HCl; 6 M Guanidin-Hydrochlorid pH 8,0; 5 mM β-Mercaptoethanol) pro Gramm Zellpellet durch 1-stündige Inkubation bei Raumtemperatur auf einem Rollenmischer. Nach 30-minütiger Zentrifugation bei 12000xg und 4 °C wurde der Überstand mit 1 ml 50%iger Ni-NTA Agarose Suspension pro 4 ml Lysat versetzt und zur Bindung der 6xHis-getaggtten Proteine an die Matrix eine Stunde bei 4 °C auf einem Rollenmischer inkubiert. Anschließend wurde diese Suspension auf eine Säule geladen und bei 4 °C zunächst jeweils zweimal mit je 4 ml Puffer B (100 mM NaH₂PO₄; 10 mM Tris-HCl; 8 M Harnstoff pH 8,0; 5 mM β-Mercaptoethanol) denaturiert sowie mit Puffer C (entspricht Puffer B mit einem pH-Wert von 6,3) gewaschen. Die Renaturierung erfolgte mit jeweils 2x 5 ml folgender Puffer abnehmender Harnstoff-Konzentration (6 M, 4 M, 2 M, 0 M Urea): 20 mM Tris-HCl; 200 mM KCl; 2 mM EDTA; 20% Glycerin pH 7,5; 1 mM β-Mercaptoethanol; 1 mM PMSF. Abschließend wurde 4x mit je 500 µl nativem Elutionspuffer (50 mM NaH₂PO₄; 300 mM NaCl; 250 mM Imidazol pH 8,0; 5 mM β-Mercaptoethanol; 1 mM PMSF) eluiert. Die Elutionsfraktionen des 6xHis-ANA wurden zusätzlich vereinigt und über eine Microcon YM-10 Säule (Millipore) aufkonzentriert.

Aufgereinigte Proteine wurden aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C aufbewahrt. Ein Aliquot der aufgereinigten Proteinfractionen wurde mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese auf qualitativen Proteingehalt überprüft (Kapitel 2.13.3).

Quantitativ wurde die Proteinkonzentration nach Bradford (1976) bestimmt (Kapitel 2.13.4).

2.13.3 SDS-PAGE

Die SDS-PAGE ist ein Verfahren, bei dem Proteine in Gegenwart von Natriumdodecylsulfat (SDS) in Polyacrylamidgelen entsprechend ihrer molaren Masse aufgetrennt werden.

Die SDS-Gelelektrophorese wurde in einem diskontinuierlichen Puffersystem unter Verwendung des Gelkammersystems der Firma Phase (17x9 cm) durchgeführt. Das SDS-Polyacrylamidgel setzte sich aus einem 12 bzw. 15%igen Trenn- [6 ml Acrylamid (Rotiphorese® 40 Gel (29:1), Roth); 5 ml 1,5 M Tris pH 8,8; 200 µl 10% SDS; 66,7 µl 30% APS; 8 µl TEMED ad 20 ml ddH₂O] und einem 4%igen Sammelgel [1 ml Acrylamid (Rotiphorese® 40 Gel (29:1), Roth); 2,5 ml 1 M Tris pH 6,8; 100 µl 10% SDS; 25 µl 30% APS; 10 µl TEMED ad 10 ml ddH₂O] zusammen. Als Laufpuffer wurde 1x Tris-Puffer [25 mM Tris; 250 mM Glycin; 0,1% (v/v) SDS] verwendet. Die Proteinproben wurden mit 2x Proteinladepuffer [20 mM Tris-HCl pH 6,8; 0,03% (w/v) Bromphenolblau; 6,5% (v/v) Glycerin; 0,75% (v/v) SDS; 139 mM β-Mercaptoethanol] versetzt und, ebenso wie der Molekulargewichtsstandard (Biorad bzw. MBI Fermentas), 5 Minuten bei 95 °C denaturiert, bevor sie auf das Gel aufgetragen wurden. Die angelegte Spannung betrug zum Einlaufen ins Sammelgel 80 Volt und im Trenngel maximal 100 Volt. Das Gel wurde eine Stunde unter leichtem Schwenken in Coomassie-Färbelösung [0,125 g Brilliant-Blue; 45% (v/v) Methanol; 10% (v/v) Essigsäure ad 500 ml deion. H₂O] angefärbt und der Hintergrund unter mehrfachem Wechsel des Entfärbers [30% (v/v) Methanol; 10% (v/v) Essigsäure] entfärbt.

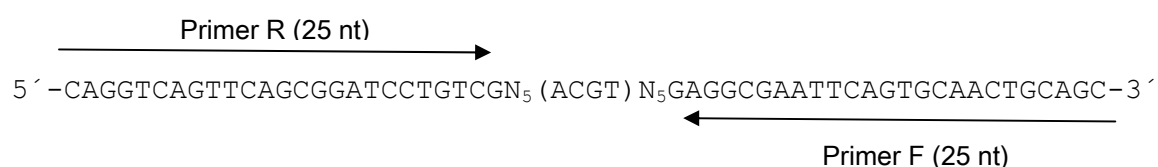
2.13.4 Quantitative Proteinbestimmung nach Bradford

Die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde nach der Methode von Bradford (1976) vorgenommen. Die Bradford-Reagenz (Roti®-Quant, Roth) wurde 1:5 mit deion. H₂O verdünnt. Nach Vermischen von 1 ml dieser Lösung mit 3-10 µl Proteinlösung und 10-minütiger Reaktionszeit wurde die Extinktion in Einmal-Plastikküvetten bei einer Wellenlänge von 595 nm gegen eine entsprechende Nullwertlösung gemessen. Die Eichgerade wurde aus einer BSA-Stammlösung (c=1 mg/ml) in Konzentrationen von 1 - 20 µg/ml Protein pro Verdünnungsstufe erstellt und weiterhin wie die Proben behandelt.

2.14 Analyse von Protein-DNA-Interaktionen

2.14.1 Random Binding Site Selection (RBSS) Assay

Die Methode der PCR unterstützten Bindungsstellenselektion wurde angewandt, um die Spezifität, mit der ein Protein an eine DNA-Zielsequenz bindet, zu bestimmen. Auf diese Weise sollte eine Consensus-Zielsequenz für den in dieser Arbeit isolierten Transkriptionsfaktor ABZ1 identifiziert werden. Das Vorgehen erfolgte nach einem Standardprotokoll der Current protocols (Ausubel, 1988). Ausgangsmaterial war eine Oligonucleotidpopulation (R64), die aus 10 zufälligen Nucleotiden mit einer zentralen G-Box core-Sequenz (ACGT) besteht und von jeweils 25 bekannten Nucleotiden, die als Primer Annealingsites notwendig sind, flankiert werden:



Zunächst wurden diese Oligonucleotide als Template eingesetzt, um durch eine Zweitstrangsynthese radioaktiv markierte, doppelsträngige Zufallsfragmente (dsR64) zu erhalten:

2 µl	50 ng/µl Oligonucleotid R64
2 µl	10x Advantage 2 Puffer (Clontech)
2 µl	0,5 mM 3dNTP Mix (-dCTP)
2 µl	40 µM dCTP
2 µl	80 ng/µl Primer F
2 µl	[α - ³² P]-dCTP
7 µl	ddH ₂ O
1 µl	5 U/µl Advantage 2 Polymerase Mix (Clontech)
20 µl	Gesamtvolumen

Einer 1-minütigen Vordenaturierung bei 94 °C schlossen sich ein 3-minütiger Annealingschritt bei 62 °C und eine 9 Minuten andauernde Elongationsphase bei 72 °C an. Nach der Zugabe von 2 µl 0,5 mM dCTP erfolgte nochmals eine 9-minütige Synthesephase bei 72 °C.

Um die doppelsträngigen DNA-Fragmente von Primermolekülen und nicht inkorporierten Nucleotiden abzutrennen sowie aufgrund der geringen Molekulargewichtsdifferenz zwischen dsR64 und Primer F wurde eine Aufreinigung über ein Polyacrylamidgel

durchgeführt. Nach einem ca. 1-stündigen Gelvorlauf in 1x TBE Puffer (10x TBE: 0,9 M Tris Base; 0,9 M Borat; 10 mM EDTA pH 8,0) bei 5 V/cm erfolgte die Auftrennung der dsR64 Fragmente über ein 10%iges nicht denaturierendes Polyacrylamidgel [3,3 ml Acrylamid (Rotiphorese® 30 Gel (37,5:1), Roth); 1 ml 10x TBE; 10 µl TEMED; 18 µl 30%iges APS ad 10 ml ddH₂O] unter den beschriebenen Bedingungen. Durch eine anschließende Exposition von 90 Sekunden konnten die radioaktiv markierten Zufallsfragmente autoradiografisch visualisiert und aus dem Gel ausgeschnitten werden. Die dsR64 Fragmente wurden in 250 µl Elutionspuffer (0,5 M Ammoniumacetat; 1 mM EDTA; 0,1% SDS) über Nacht bei 55 °C eluiert. Der Überstand wurde mit 1 µg Glycogen und 500 µl Ethanol versetzt, die DNA vier Stunden lang bei -20 °C gefällt und anschließend durch eine 1-stündige Zentrifugation bei 15000xg pelletiert. Nach Waschen der dsR64 Fragmente wurde das Pellet getrocknet und in 10 µl LTE (10 mM Tris pH 7,6; 0,1 mM EDTA pH 8,0) aufgenommen.

Für die Bindungsreaktion wurden radioaktiv markierte dsR64 Fragmente mit einer spezifischen Aktivität von 1×10^4 cpm, 1,4 µg rekombinantes und aufgereinigtes ABZ1 sowie 0,2-2 µg Poly(dI-dC) in einem Gesamtvolumen von 15 µl 1x Bindepuffer [10 mM Tris-HCl pH 7,5; 40 mM NaCl; 1 mM EDTA; 4% (v/v) Glycerin; 10 mM β-Mercaptoethanol; 10 mM DTT; 5 mM PMSF; Schindler und Cashmore (1990)] eingesetzt. Die Reaktion verlief 30 Minuten lang bei Raumtemperatur. Nach Zusatz von nicht denaturierendem 5x Ladepuffer (50 mM EDTA pH 8,0; 50 mM Tris-HCl pH 8,0; 12,5 mg/10 ml Bromphenolblau; 12,5 mg/10 ml Xylencyanol) wurde der Bindungsansatz in einem nicht denaturierenden 6,5%igen Polyacrylamidgel [2,2 ml Acrylamid (Rotiphorese® 30 Gel (37,5:1), Roth); 1 ml 10x Tris-Glycin-Puffer; 10 µl TEMED; 18 µl 30%iges APS ad 10 ml ddH₂O] in 1x Tris-Glycin-Puffer (25 mM Tris-HCl; 190 mM Glycin; 1 mM EDTA pH 8,3) bei 4 °C aufgetrennt. Das Gel wurde über Nacht exponiert und die durch ABZ1 gebundenen dsR64 Sequenzen der retardierten Komplexe, wie oben beschrieben, aus dem Gel extrahiert. Nachfolgend wurden die selektierten DNA Sequenzen in einem ähnlichen Ansatz, wie oben aufgeführt, durch PCR amplifiziert. Die Abweichungen sind im Folgenden erläutert: Statt R64 wurden 10 ng der selektierten DNA Fragmente der vorangegangenen Bindungsreaktion als Template eingesetzt, zusätzlich wurden 2 µl 80 ng/µl Primer R zugefügt und es wurde lediglich 1 µl [α -³²P]-dCTP zur Markierung verwendet. Das Temperaturprogramm umfasste 20 Zyklen: 1 Minute 94 °C, 1 Minute 62 °C und 1 Minute 72 °C. Daran schloss sich die Aufreinigung der Sonde, wie für dsR64 beschrieben, an. Diese aufgereinigten Fragmente wurden in einer neuen Bindungsreaktion eingesetzt. Insgesamt wurden fünf solcher Runden bestehend aus Bindungsstellenselektion und -amplifikation durchgeführt. Die selektierten Bindungsstellen wurden in pCR®2.1 kloniert (Kapitel 2.11) und sequenziert.

2.14.2 Elektrophoretische Gelshift Experimente

In den durchgeführten Gelshift Experimenten wurden die Bindungsspezifitäten von DNA bindenden Proteinen, wie dem rekombinanten ABZ1, den rekombinanten ABZ1 Deletionsmutanten oder dem rekombinanten ANA an ihre potentiellen DNA Zielsequenzen untersucht.

2.14.2.1 DNA-Fragmente (Sonden) und Kompetitoren

Als DNA-Fragmente für die elektrophoretischen Mobilitätsshift Experimente wurden folgende Fragmente mittels PCR radioaktiv markiert, aus einem Polyacrylamidgel extrahiert und als Sonde eingesetzt. Kompetitor-Fragmente blieben unmarkiert.

Alle Fragmente, die als potentielle Zielsequenzen für ABZ1 aus dem Random Binding Site Selection Assay (Kapitel 3.3.3, Tab. 5) hervorgegangen sind, werden nachfolgend mit RBSS und der entsprechenden Klon Nummer bezeichnet. Die PCR Bedingungen zur Amplifikation der radioaktiv markierten RBSS-Sonden entsprachen denen zur Amplifikation der selektierten Fragmente (Kapitel 2.14.1). Als Template wurden die in pCR[®]2.1 subklonierten RBSS Fragmente eingesetzt (pCR2.1-RBSS) und eine zusätzliche 5-minütige Vordenaturierung bei 94 °C durchgeführt. Als Kompetitoren wurden chemisch synthetisierte Oligonucleotide eingesetzt, die in äquimolaren Mengen vereinigt, 5 Minuten bei 95 °C denaturiert, 15 Minuten bei 65 °C annealt, 20 Minuten bei 37 °C und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert wurden. Die Sequenz des spezifischen Kompetitor-Fragmentes (sK1) entspricht der von RBSS1, während der unspezifische Kompetitor (uK1) eine Mutation innerhalb der G-Box core-Sequenz von RBSS1 enthält (ACGT → ATTA). Die 5' und 3' flankierenden 25 Basenpaare sind für alle RBSS Fragmente identisch. Die unterstrichenen Sequenzen heben die zufälligen bzw. selektierten Basenpaare hervor, während die G-Box Core Sequenz als graue bzw. Mutationen innerhalb dieser Sequenz als grau unterlegte Buchstaben dargestellt sind.

RBSS1	5' -CAGGTCAGTTCAGCGGATCCTGTCGGGTTGACGTGGGAAGAGGCGAATTCAGTGCAACTGCAGC-3'
Δ sK1:	3' -GTCCAGTCAAGTCGCCTAGGACAGCCCAACTGCACCCCTTCTCCGCTTAAGTCACGTTGACGTCG-5'
RBSS1.1:	5' -CAGGTCAGTTCAGCGGATCCTGTCGGGGCCACGTGGTGTGAGGCGAATTCAGTGCAACTGCAGC-3'
	3' -GTCCAGTCAAGTCGCCTAGGACAGCCCCGGTGCACCACTCCGCTTAAGTCACGTTGACGTCG-5'
RBSS2.1	5' -CAGGTCAGTTCAGCGGATCCTGTCGTGTCCACGTAAGACGAGGCGAATTCAGTGCAACTGCAGC-3'
	3' -GTCCAGTCAAGTCGCCTAGGACAGCACAGGTGCATTCTGCTCCGCTTAAGTCACGTTGACGTCG-5'
RBSS5:	5' -CAGGTCAGTTCAGCGGATCCTGTCGTGCACACGTGTCGCGAGGCGAATTCAGTGCAACTGCAGC-3'
	3' -GTCCAGTCAAGTCGCCTAGGACAGCACGTGTGCACAGCGCTCCGCTTAAGTCACGTTGACGTCG-5'
RBSS6.1:	5' -CAGGTCAGTTCAGCGGATCCTGTCGGGATGACGTGTAGGGAGGCGAATTCAGTGCAACTGCAGC-3'
	3' -GTCCAGTCAAGTCGCCTAGGACAGCCCTACTGCACATCCCTCCGCTTAAGTCACGTTGACGTCG-5'

RBSS8: 5' -CAGGTCAGTTCAGCGGATCCTGTCGGCCTTACGTGGGCTGAGGCGAATTCAGTGCAACTGCAGC-3'
 3' -GTCCAGTCAAGTCGCCTAGGACAGCCGGAATGCACCCGACTCCGCTTAAGTCACGTTGACGTCG-5'

RBSS9: 5' -CAGGTCAGTTCAGCGGATCCTGTCGTTTATACGTGTCGCGAGGCGAATTCAGTGCAACTGCAGC-3'
 3' -GTCCAGTCAAGTCGCCTAGGACAGCAAAATATGCACAGCGCTCCGCTTAAGTCACGTTGACGTCG-5'

RBSS10.1: 5' -CAGGTCAGTTCAGCGGATCCTGTCGTTGTGATGTGGGTAGAGGCGAATTCAGTGCAACTGCAGC-3'
 3' -GTCCAGTCAAGTCGCCTAGGACAGCAACACTACACCCATCTCCGCTTAAGTCACGTTGACGTCG-5'

uK1: 5' -CAGGTCAGTTCAGCGGATCCTGTCGGGTTGATTAGGGAAGAGGCGAATTCAGTGCAACTGCAGC-3'
 3' -GTCCAGTCAAGTCGCCTAGGACAGCCCAACTAATCCCTTCTCCGCTTAAGTCACGTTGACGTCG-5'

Die Bindungsstudien von ANA sowie von ABZ1 an den CaMV 35S Promotor wurden mit einem 118 bp großen 35S Promotorfragment (CaMV 35S, siehe unten), das drei ACGT Core Sequenzen (graue Buchstaben) enthält, als Sonde durchgeführt. Für die Analyse der DNA Bindung mit ANA wurde das unmarkierte CaMV 35S Fragment als spezifischer Kompetitor eingesetzt, während ein 93 bp großes Fragment (uK93, siehe unten) als unspezifischer Kompetitor verwendet wurde. uK93 entspricht einer Sequenz des vollständigen cDNA Klons von ABZ1, die keine ACGT Sites enthält.

Fragment	Sequenz
CaMV 35S:	5' -TATGTCGACCGAGGAACATCGTGGAAAAAGAAGACGTTCCAACCACGCTCTTCAAAGCAAGTGGA 3' -ATACAGCTGGCTCCTTGTAGCACCTTTTTCTTCTGCAAGGTTGGTGCAGAAGTTTCGTTACCTT TTGATGTGATATCTCCACTGACGTAAGGGATGACGCACAATCCCAGTCGACTAT-3' AACTACACTATAGAGGTGACTGCATTCCCTACTGCGTGTTAGGGTCAGCTGATA-5'
PCR Primer	
35S-5' (3464)	5' -TATGTCGACCGAGGAACATAGTGGAAAAAG-3' <i>SalI</i>
35S-3' (3465)	5' -ATAGTCGACTGGGATTGTGCGTCATCCCTT-3' <i>SalI</i>

Fragment	Sequenz
uK93:	5' -TATACTCGAGATGTCACCTTTAAGGCAGAGTGCTAGTTCATCTGCATCAGATGATGATCAAAGG 3' -ATATGAGCTCTACAGTGGAATTCGCTCTCAGGATCAAGTAGACGTAGTCTACTACTAGTTTCC TATGCAGGAATGGATGAGACCATGGATAT-3' ATACGTCCTTACCTACTCTGGTACCTATA-5'

PCR Primer	
74/5- <i>XhoI</i> (3476)	5' -TATACTCGAGATGTCACCTTTAAGGCAGAG-3' <i>XhoI</i>
74/3-oNLS- <i>NcoI</i> (3479)	5' -ATATCCATGGTCTCATCCATTCCCTGCATAC-3' <i>NcoI</i>

Die Kompetitorfragmente wurden durch PCR, wie in Kapitel 2.13.1 beschrieben mit einer Annealingtemperatur von 60 °C, amplifiziert. Als Templates für CaMV 35S bzw. uK93 dienten pRT103-GUS bzw. pSport1-MT74. Die entsprechenden PCR Primer sind oben aufgeführt, einschließlich ihrer Labor-internen Nummerierung in Klammern. Die Aufreinigung der Kompetitoren erfolgte durch Extraktion aus einem Agarosegel mittels

„QIAquick®Gel Extraction Kit“ von Qiagen entsprechend den Herstellerangaben. Die Bindungsspezifität von ABZ1 an den CaMV 35S Promotor wurde durch Konkurrenz mit den oben aufgeführten Fragmenten sK1 und uK1 untersucht.

Nachfolgend sind die PCR Bedingungen zur Amplifikation des radioaktiv markierten CaMV 35S-Fragmentes aus pRT103-GUS aufgeführt.

PCR-Ansatz:

2 µl	Template DNA (100 ng/µl pRT103-GUS)
5 µl	10x Advantage 2 Puffer (Clontech)
2 µl	1 mM 3dNTP Mix (-dCTP)
4 µl	40 µM dCTP
2 µl	80 ng/µl 5'Primer
2 µl	80 ng/µl 3'Primer
4 µl	[α - ³² P]dCTP
27 µl	ddH ₂ O
2 µl	5 U/µl Advantage 2 Polymerase Mix (Clontech)
50 µl	Gesamtvolumen

Temperaturprogramm:

6 Minuten	94 °C
3 Minuten	60 °C
9 Minuten	72 °C
2 µl 1 mM dCTP	
9 Minuten	72 °C

2.14.3 Native Polyacrylamidgelelektrophorese der Protein-DNA-Bindungsreaktionen

Die Durchführung der Gelshift-Experimente erfolgte im Wesentlichen nach Current Protocols (Ausubel *et al.*, 1988). Dazu wurden in Abhängigkeit des verwendeten radioaktiv markierten Fragmentes unterschiedliche Protein- und DNA-Mengen eingesetzt.

Im elektrophoretischen Gelshift Experiment zur Verifizierung der selektierten DNA-Bindungsstellen von ABZ1 wurden 1 µg rekombinantes de- und renaturierend aufgereinigtes ABZ1 sowie jeweils 0,1 ng (4×10^3 cpm) eines selektierten, 64 bp langen DNA-Fragmentes eingesetzt (Kapitel 2.14.2.1). Für die Bindungsstudien sowohl des rekombinanten ABZ1 als auch des rekombinanten ANA wurden jeweils 500 ng Protein mit 0,3 ng (2×10^3 cpm) des 118 bp großen 35S CaMV Promotors Fragmentes inkubiert.

1 µg ABZ1 oder bzw. und 770 ng – 2,5 µg der ABZ1-Mutanten ABZ1₁₋₁₀₀ und ABZ1₄₇₋₁₃₈ wurden zusammen mit 0,05 ng (2×10^3 cpm) bzw. 0,1 ng (4×10^3 cpm) des RBSS1-Fragmentes zur *in vitro* Untersuchung der DNA-Bindungsdomäne bzw. der ABZ1-Dimerisierung eingesetzt. Alle Bindungsreaktionen verliefen in einem Gesamtvolumen von 15 µl unter Verwendung eines Bindepuffers nach Schindler und Cashmore (1990) [10 mM Tris-HCl pH 7,5; 40 mM NaCl; 1 mM EDTA; 4% (v/v) Glycerin; 10 mM β-Mercaptoethanol; 10 mM DTT; 5 mM PMSF; 2 µg/15 µl poly(dI-dC)]. Die Inkubationsdauer betrug 30 Minuten bei Raumtemperatur. Für Kompetitionsversuche wurde der Kompetitor vor Zugabe des radioaktiv markierten Fragmentes in 1000- bis 100000-fach molarem Überschuß mit Bindepuffer und Proteinextrakt 15 Minuten lang inkubiert. Durch Zugabe von 3 µl nicht denaturierenden 5x Ladepuffers (50 mM EDTA pH 8,0; 50 mM Tris-HCl pH 8,0; 50% (v/v) Glycerin; 12,5 mg/10 ml Bromphenolblau; 12,5 mg/ 10 ml Xylencyanol) wurde die Bindereaktion gestoppt und auf ein natives Polyacrylamidgel aufgetragen. Entsprechend der zu erwartenden Protein-DNA-Komplexe wurden 5-9%ige native Polyacrylamidgele [1 ml 10x Tris-Glycin-Puffer; 1,7–3 ml Acrylamid (Rotiphorese® 30 Gel (37,5:1), Roth); 10 µl TEMED; 18 µl 30%iges APS ad 10 ml ddH₂O] von 0,5-0,75 mm Dicke verwendet. Die Elektrophorese erfolgte nach einem ca. 60-minütigen Vorlauf bei 5-6 V/cm und 4 °C drei bis vier Stunden lang in einer PAGE-Kammer der Fa. Serva (Blue Vertical 101) bzw. acht Stunden lang in einer PHASE-Kammer (18 x 20 cm) bis die Bromphenolblaubande ca. 1 cm vom unteren Gelrand entfernt war. Als Elektrophoresepuffer wurde 1x Tris-Glycin-Puffer eingesetzt. Nach Trocknen des Gels auf einer Vakuum-Wärmeplatte der Fa. Biotec-Fischer wurde es autoradiografiert.

2.15 Transiente Transformation von Pflanzenmaterial

2.15.1 Untersuchung der Kernlokalisation von ABZ1 und ANA in

Zwiebelepidermiszellen

2.15.1.1 DNA-Konstrukte

Die auf Kernlokalisation zu untersuchenden Proteinbereiche von ABZ1 und ANA wurden mittels PCR amplifiziert. Als Template wurde je 1 ng des vollständigen cDNA Klon von ABZ1 bzw. von ANA eingesetzt. Die verwendeten Primer, Labor-interne DNA-Nummern und Sequenzen sind in Tabelle 2, Spalte 2 und 3 aufgeführt, wobei die cDNA-spezifischen Sequenzen durch Fettdruck gekennzeichnet sind. Sie enthalten eine Schnittstelle für eine Restriktionsendonuclease (Unterstreichung; *Xho*I oder *Nco*I bzw. *Sal*I oder *Pag*I) und sind so konzipiert, dass eine translationale Fusion zwischen den

klonierten Proteinfragmenten und der β -Glucuronidase entsteht. Die PCR-Ansätze setzten sich grundsätzlich, wie in Kapitel 2.13.1 aufgeführt, zusammen. Das verwendete Temperaturprogramm bestand nach einer 5-minütigen Vordenaturierung bei 94 °C aus 30 Zyklen mit je 1-minütiger Denaturierung bei 94 °C und Annealingphase bei 60 °C sowie einem 1 Minute und 30 Sekunden andauernden Elongationsschritt bei 72 °C bevor eine 10-minütige Endelongation bei 72 °C erfolgte.

Anschließend wurden die ABZ1 PCR-Fragmente mit *XhoI/NcoI* bzw. die ANA PCR-Fragmente mit *SalI/PagI* gespalten und unter Einsatz des „NucleoSpin® Extract“ Kits von Macherey-Nagel aus einem Agarosegel aufgereinigt. Die entstanden Fragmente konnten direktionell so in den *XhoI/NcoI* gespaltenen pRT103-GUS Vektor kloniert werden, dass ein offener Leseraster mit dem β -Glucuronidasegen entstand. Dabei ist zu beachten, dass sowohl *SalI* und *XhoI* als auch *PagI* und *NcoI* kompatible Enden aufweisen. Um eine korrekte Expression der Fusionsproteine, die sich aus einem N-terminalen ABZ1- bzw. ANA- sowie einem C-terminalen GUS-Anteil zusammensetzen, sicherzustellen, wurden alle Konstrukte sequenziert. In Tabelle 2 sind alle Konstrukte, die zur Kernlokalisierungsuntersuchung eingesetzt wurden, einschließlich ihrer internen DNA-Nummer aufgeführt, wobei die tiefgestellten Zahlen die klonierten Sequenzen der codierenden Bereiche in Aminosäuren angeben (Spalte 1). pRT103-ABZ1₁₋₁₃₈-GUS und pRT103-ANA₁₋₃₀₁-GUS enthalten jeweils die gesamte codierende Sequenz der entsprechenden Proteine, während pRT103-ABZ1₁₋₄₄-GUS und pRT103-ANA₁₋₁₃₆-GUS C-terminal verkürzte Proteinfragmente enthalten. Die N-Termini der untersuchten Proteine, die mit der β -Glucuronidase fusioniert worden waren, sind als pRT103-ABZ1₁₋₂₄-GUS, das das potentielle Kernlokalisierungssignal (NLS) nicht mehr enthält, bzw. pRT103-ANA₁₋₇₆-GUS bezeichnet. Das Konstrukt pRT103-ABZ1₄₅₋₁₃₈-GUS verfügt über ein C-terminales ABZ1-Fragment ohne NLS. pRT103-GUS wurde als Kontrollplasmid für eine fehlende Kernlokalisation der β -Glucuronidase eingesetzt.

Tab. 2: Konstruktbezeichnungen, die entsprechenden PCR-Primerbezeichnungen sowie deren Sequenz, die für die Kernlokalisierungsstudien von ABZ1 und ANA eingesetzt wurden

Plasmid (DNA-Nr.)	Primer (DNA-Nr.)	PCR-Primer Sequenz
pRT103-ABZ1 ₁₋₁₃₈ -GUS (2940)	74/5'- <i>XhoI</i> (3476)	5'-TATACTCGAGATGTCACCTTTAAGGCAGAG-3' <i>XhoI</i>
	74/3'- <i>NcoI</i> (3477)	5'-ATATCCATGGAAAATTTAAACAATCCTGATG-3' <i>NcoI</i>
pRT103-ABZ1 ₁₋₄₄ -GUS (2941)	74/5'- <i>XhoI</i> (3476)	5'-TATACTCGAGATGTCACCTTTAAGGCAGAG-3' <i>XhoI</i>
	74/3'-NLS- <i>NcoI</i> (3478)	5'-ATATCCATGGGCTTCTTCATCCTCGATCGC-3' <i>NcoI</i>
pRT103-ABZ1 ₁₋₂₄ -GUS (2942)	74/5'- <i>XhoI</i> (3476)	5'-TATACTCGAGATGTCACCTTTAAGGCAGAG-3' <i>XhoI</i>
	74/3'-oNLS- <i>NcoI</i> (3479)	5'-ATATCCATGGTCTCATCCATTCTGCATAC-3' <i>NcoI</i>

pRT103-ABZ1 ₄₅₋₁₃₈ -GUS (3077)	74/5'-oNLS- <i>XhoI</i> (3480) 74/3'- <i>NcoI</i> (3477)	5'-TATACTCGAGATGCAGAAAGCTTCTGCAAGATTGAC-3' <i>XhoI</i> 5'-ATATCCATGGAAAATTTAAACAATCCTGATG-3' <i>NcoI</i>
pRT103-ANA ₁₋₃₀₁ -GUS (3161)	ANA-5' <i>SalI</i> (3495) ANA-3' <i>PagI</i> -3 (3492)	5'-TATAGTCGACATGAACAAAGGAGCAAACGG-3' <i>SalI</i> 5'-ATATTCATGAAGTAAGGTTTTTGCATGTATAGGAACAT-3' <i>PagI</i>
pRT103-ANA ₁₋₁₃₆ -GUS (3162)	ANA-5' <i>SalI</i> (3495) ANA-3' <i>PagI</i> -2 (3491)	5'-TATAGTCGACATGAACAAAGGAGCAAACGG-3' <i>SalI</i> 5'-ATATTCATGAAGCGGTACTCGTGCATAATCCA-3' <i>PagI</i>
pRT103-ANA ₁₋₇₆ -GUS (3163)	ANA-5' <i>SalI</i> (3495) ANA-3' <i>PagI</i> -1 (3490)	5'-TATAGTCGACATGAACAAAGGAGCAAACGG-3' <i>SalI</i> 5'-ATATTCATGAATCCCTTGGTGAGAAAAAATACC-3' <i>PagI</i>

2.15.1.2 Transformation von Zwiebelepidermiszellen

Zwiebelepidermen liegen in ein-zelligen Schichten vor, die eine einfache mikroskopische Untersuchung dieser Pflanzenzellen ermöglichen. Deshalb wurden für die Analyse der Kernlokalisierung von ABZ1 und ANA Zwiebelepidermiszellen eingesetzt. Die Epidermis wurde von der Innenseite der einzelnen Zwiebelschichten mit einer Pinzette abgezogen, ca. 2 x 3 cm große Stücke auf 3%igem MS-Medium (4,3 g Murashige-Skoog Medium; 180 mg KH₂PO₄; 30 g Saccharose pH 5,7 mit KOH ad 1000 ml deion. H₂O; 1 mg/l Thiamin; 10 mg/l Myoinositol) ausgelegt und mit den entsprechenden Konstrukten (Kapitel 2.15.1.1) durch die Partikelkanone transformiert. Dazu mussten die Plasmide, die die Reporterfusionskonstrukte tragen, auf Goldpartikeln fixiert werden.

Das Beladen der Goldpartikel erfolgte nach einem Protokoll von Klein *et al.* (1988). 3 mg Goldpartikel (Chempur, Ø 0,3-3 µm) wurden mit 100 µl 70%igem Ethanol versetzt, resuspendiert (Vortex) und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Goldpartikel wurden 1 Minute bei 1790xg pelletiert. Nach Abziehen des Überstandes wurden die Goldpartikel in 50 µl ddH₂O aufgenommen (Vortex) und 10-minütige Inkubation bei Raumtemperatur gewaschen. Anschließend wurde 1 Minute bei 22xg ungebremst zentrifugiert und die Goldpartikel in 50 µl 50%igem Glycerin resuspendiert (Vortex) und 10 Sekunden lang im Ultraschallbad behandelt. Auf Eis wurden 10 µg der unterschiedlichen NLS-Konstrukte (Kapitel 2.15.1.1) zugefügt und vorsichtig durchmischt. Nach 15-minütiger Inkubation auf Eis wurden 50 µl 2,5 M CaCl₂ zum Präzipitieren der DNA hinzugefügt, durchmischt und nach einer weiteren Minute erfolgte die Zugabe von 20 µl kaltem 0,1 M Spermidin zum Schutz der gefällten DNA. Nach Durchmischen und 10-minütiger Inkubation auf Eis wurde 15 Sekunden ungebremst bei 22xg zentrifugiert. Der Überstand wurde abgezogen und die beladenen Goldpartikel wurden zunächst durch vorsichtiges Resuspendieren in 100 µl 70%igem Ethanol und

erneute ungebremste Zentrifugation bei 22xg gewaschen. Das Pellet wurde in 50 µl 98%igem Ethanol aufgenommen und die Zentrifugation bei 22xg wiederholt. Schließlich wurden die mit DNA beladenen Goldpartikel in 35 µl 98%igem Ethanol resuspendiert. Pro Makrocarrier wurden 5-7 µl dieser Suspension, die direkt vor dem Auftragen 2-3 Sekunden mit Ultraschall behandelt wurde, aufgegeben und 5 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet.

Die Transformation der Zwiebelepidermiszellen erfolgte nach Sanford (1988) in der Partikelkanone (Du Pont, PDS-1000) mit 600-700 psi in einem Vakuum von 25 mm Quecksilbersäule. Dabei betrug der Abstand zwischen Makrocarrier und zu transformierendem Pflanzengewebe 7,5 cm.

Die transiente Expression der ABZ1- bzw. ANA-GUS-Fusionsproteine erfolgte 20-24 Stunden bei 24 °C unter Tag/Nacht Bedingungen bevor die Zwiebelepidermiszellen dann im histochemischen GUS-Test auf Kernlokalisation der Fusionskonstrukte untersucht wurden (Kapitel 2.15.1.3).

2.15.1.3 Histochemischer GUS-Test (Zwiebelepidermis)

Das transformierte Zwiebelepidermisgewebe (Kapitel 2.15.1.2) wurde in eine 1 µg/ml 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-glucuronic acid (X-Gluc) enthaltende GUS-Färbelösung nach Isono *et al.* (1999) [50 mM NaPO₄ pH 7,0; 1 mM EDTA; 0,1% (v/v) Triton X-100; 1 mM K-ferrocyanid; 1 mM K-ferricyanid] gegeben und vier Stunden bei 37 °C inkubiert, um die blaue GUS-Färbung zu entwickeln. Zum Mikroskopieren wurden die Zwiebelepidermiszellen in 50 mM NaPO₄ pH 7,0 überführt. Durch die Zugabe von 1 µg/ml 4'-6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) und 15-minütige Inkubation bei Raumtemperatur konnten die Zellkerne im Fluoreszenzmikroskop (Axioplan 2, Zeiss) mit einem Filter der Wellenlänge 360-370 nm sichtbar gemacht werden.

2.15.2 Funktionelle Untersuchung von ABZ1 und ANA im transienten System

2.15.2.1 DNA-Konstrukte für Cotransformations-Untersuchungen

Nachfolgend sind die Konstrukte beschrieben, deren transiente Expression in Blattmaterial von Tabak und Tomate untersucht wurde. Den Konstruktbezeichnungen sind die Labor-internen DNA-Nummern in Klammern angefügt.

pVKH-35S-pA1 (3578): Alle Effektorstrukturen basieren auf diesem T-DNA Vektor, der den CaMV 35S Promotor, einen Klonierungslinker sowie ein Polyadenylierungssignal

besitzt. pVKH-35S-pA1 wurde als Effektorplasmid zur Bestimmung der Hintergrund-Aktivität eingesetzt.

pVKH-35S-ABZ1-pA1 (3130): Der kodierende Bereich des bZIP Transkriptionsfaktors ABZ1 wurde zunächst durch PCR unter Verwendung des Templates pSport1-MT74 sowie der Primer 74/5' und 74/3' amplifiziert (Kapitel 2.13.1, Tab. 1), in pCR®2.1 kloniert (Kapitel 2.11) und sequenziert. Das mit *Bam*HI und *Sma*I gespaltene Fragment wurde in pVKH-35S-pA1 (*Hind*III, fill-in, *Bam*HI, CIAP) subkloniert. Dieses Konstrukt wurde als Effektor verwendet.

pVKH-35S-Gal4AD-ABZ1-pA1 (3346): Die Aktivierungsdomäne des β -Galactosidasegens aus *Saccharomyces cerevisiae* (GAL4AD) wurde durch PCR amplifiziert, wobei die Annealingtemperatur 60 °C betrug (Kapitel 2.13.1). Als Template diente pGADT7-Rec (Kapitel 2.8). Die Sequenzen der eingesetzten Primer sind mit Bezeichnung und interner DNA-Nummer nachfolgend aufgeführt:

Template	Primer (DNA-Nr.)	Primersequenz
pGADT7-Rec	5'Gal4 (3466)	5'-TATAGGATCCCATGGCCAATTTTAATCAAAGTGGGA-3'
	3'Gal4 (3467)	5'-ATATGGATCCCTCTTTTTTTGGGTTTGGTGGGGT-3'

Das *Bam*HI geschnittene PCR-Fragment wurde in den ebenfalls *Bam*HI geschnittenen und dephosphorylierten pVKH-35S-ABZ1-pA1 Vektor (siehe oben) kloniert. Die korrekte Orientierung des klonierten GAL4AD-Inserts wurde durch eine Testspaltung mit *Ssp*I sichergestellt und der Leseraster durch Sequenzierung überprüft. So entstand eine translationale Fusion zwischen der GAL4-Aktivierungsdomäne und ABZ1. Dieses Konstrukt diente als Effektor.

pVKH-35S-ANA-pA1 (3781): Der kodierende Bereich des NAC Transkriptionsfaktors ANA wurde zunächst durch PCR unter Verwendung des Templates pSport1-MT172 sowie der Primer MT172/5' und MT172/3' amplifiziert (Kapitel 2.13.1, Tab. 1), in pCR®2.1 kloniert und sequenziert. Das mit *Bam*HI und *Sal*I gespaltene Fragment wurde in pVKH-35S-pA1 (*Bam*HI, *Sal*I, CIAP) subkloniert. Dieses Konstrukt wurde als Effektor verwendet.

pBT10-35S-GUS (3148): Dieses Reporterplasmid verfügt über den CaMV 35S Promotor, der die Expression des Reportergens β -Glucuronidase (GUS) kontrolliert. Das ca. 500 bp große CaMV 35S Promotorfragment wurde mit *Nco*I und *Pst*I aus pRT103-GUS herausgeschnitten und in den ebenso geschnittenen pBT10-TATA-GUS Vektor (Sprenger-Haussels und Weisshaar, 2000) kloniert. Dadurch wurde der Minimalpromotor des pBT10-TATA-GUS Vektors durch den CaMV 35S Promotor ersetzt.

pRT101-LUC (2821): Dieser Vektor besitzt ein durch den CaMV 35S Promotor kontrolliertes Luciferasegen und diente der Transformationskontrolle.

pC1L-1097 (3666): Dieser Vektor wurde freundlicher Weise von Dietmar Stahl der Planta GmbH in Einbeck zur Verfügung gestellt. Ein 1151 bp großes genomisches Fragment des *cab11* Gens aus der Zuckerrübe wurde translational mit dem Luciferasegen aus *pluc-nos2* fusioniert. Das genomische Fragment enthält eine 1097 bp lange, nicht transkribierte Promotorsequenz (C1-Promotor), die keine G-Box core Sequenzen aufweist (GenBank Acc.No. AX449166). pC1L-1097 diente als Plasmid zur Transformationskontrolle.

pVKH-C1-pA1, pVKH-C1-ABZ1-pA1, pVKH-C1-GAL4AD-ABZ1-pA1 (3776, 3777, 3778): Zunächst wurde der C1 Promotor durch *Hind*III Spaltung von pC1L-1097, Auffüllen der Enden und eine anschließende Spaltung mit *Bam*HI aus pC1L-1097 herausgeschnitten. Das C1-Fragment konnte direktionell in pVKH-35S-pA1, pVKH-35S-ABZ1-pA1 und pVKH-35S-GAL4AD-ABZ1-pA1 (*Sac*I, Auffüllen der Enden, *Bam*HI) kloniert werden, wodurch der 35S Promotor der Effektorplasmide durch C1 ersetzt wurde.

2.15.2.2 Transformation von Tabak- und Tomaten-Blattmaterial

Im Folgenden werden die Untersuchungen an transient transformiertem Pflanzengewebe beschrieben, die an Blattmaterial sowohl von Tabak- als auch von Tomatenpflanzen vorgenommen wurden.

Für die transienten Assays zur Analyse der Regulation des CaMV 35S Promotors durch ANA bzw. ABZ1 wurden Blatt-Explantate 2-4 Monate alter Tabakpflanzen ausgestanzt, die einen Durchmesser von 4 cm aufwiesen. Das zu transformierende Blattmaterial wurde auf feuchtem 3MM Whatmanpapier ausgelegt.

Um die Auswirkungen von ANA auf den CaMV 35S Promotor zu analysieren, wurde ein Reporter (pRT10-35S-GUS) zusammen mit einem Effektor (pVKH-35S-ANA-pA1) bzw. ohne Effektor (pVKH-35S-pA1) sowie einer Transformationskontrolle (pC1L-1097) coexprimiert. Dazu wurden 3 mg Gold mit äquimolaren Mengen der entsprechenden Konstrukte beladen (Tab. 3a). Es wurde eine Versuchsreihe mit 4 Transformationsereignissen durchgeführt.

Tab. 3a: Bezeichnungen und Mengenangaben der Konstrukte, die zur transienten Analyse der CaMV 35S Promotor Regulation durch ANA eingesetzt wurden.

Effektor	pVKH-35S-ANA-pA1	8,93 µg
	pVKH-35S-pA1	8,25 µg
Reporter	pBT10-35S-GUS	3,51 µg
Kontrolle	pC1L-1097	4,63 µg

Um die Regulation des CaMV 35S Promotors durch ABZ1 zu untersuchen, wurde vergleichbar verfahren. Als Effektorkonstrukte wurden pVKH-35S-pA1, pVKH-35S-ABZ1-pA1 und pVKH-35S-GAL4AD-ABZ1-pA1 untersucht bzw. die entsprechenden Konstrukte, die statt des CaMV 35S Promotors den C1 Promotor enthalten. Als Reporterplasmid wurde pBT10-35S-GUS verwendet. Die Reporterogenaktivität des pC1L-1097 Kontrollplasmids erlaubte Rückschlüsse auf die Transformationseffizienz. Zum Beladen von 3 mg Goldpartikeln wurden die drei Plasmidtypen, die cotransformiert werden sollten, in äquimolaren Mengenverhältnissen in einem Gesamtvolumen von 7 µl eingesetzt (Tab. 3b). Die Ansätze, in denen ABZ1 durch den 35S Promotor reguliert wird, wurden dreimal mit je 4 Transformationsereignissen durchgeführt. Die Experimente, in denen C1-ABZ1 als Effektor eingesetzt wurde, wurden zweimal analysiert, wobei jede Versuchsreihe 4 Transformationsansätze umfasste.

Tab. 3b: Bezeichnungen und Mengenangaben der Konstrukte, die zur transienten Analyse der CaMV 35S Promotor Regulation durch ABZ1 eingesetzt wurden.

Effektor	pVKH-35S-pA1	6,66 µg	pVKH-C1- pA1	8,64 µg
	pVKH-35S-ABZ1-pA1	6,91 µg	pVKH-C1-ABZ1-pA1	8,95 µg
	pVKH-35S-GAL4AD-ABZ1-pA1	7,11 µg	pVKH-C1-GAL4AD-ABZ1-pA1	9,21 µg
Reporter	pBT10-35S-GUS	2,83 µg	pBT10-35S-GUS	3,51 µg
Kontrolle	pC1L-1097	3,73 µg	pC1L-1097	4,63 µg

3 mg beladene Goldpartikel wurden auf 4 Transformationsereignisse aufgeteilt. Die Transformation erfolgte mit 1100 psi in einem Vakuum von 25 mm Quecksilbersäule. Der Abstand zwischen Makrocarrier und zu transformierendem Pflanzengewebe betrug 7,5 cm. Nach 24-stündiger Inkubation des transformierten Gewebes bei 24 °C im Tag/Nacht Rhythmus wurden Proteinextrakte hergestellt und quantitative Proteinbestimmungen sowie LUC- und GUS-Aktivitätsmessungen vorgenommen (Kapitel 2.15.2.3 - 2.15.2.5). Für die Untersuchungen zur Aktivität des CaMV 35S Promotors unter aeroben und anaeroben Bedingungen wurde das zu transformierende Pflanzenmaterial wie

folgt präpariert: Vier ausgestanzte Tabakblattscheiben mit einem Durchmesser von je 2 cm bzw. vier Tomaten-Fiederblättchen vergleichbarer Größe wurden um das Zentrum der Petrischale, in der sie zur Transformation durch die Partikelkanone auslagen, angeordnet. Das eingesetzte Blattmaterial stammte von 2-4 Monate alten Tabak- bzw. 3-4 Monate alten Tomatenpflanzen. Bei den cotransformierten Konstrukten handelte es sich um 3,92 µg des Reporterplasmids pBT10-35S-GUS und 4,22 µg des Kontrollplasmids pRT101-LUC. Die Transformationsbedingungen entsprachen den oben aufgeführten Parametern. Sowohl mit Tabak- als auch mit Tomaten-Blattmaterial wurden jeweils acht Transformationen durchgeführt. Nach der Transformation wurde das Blattmaterial jedes einzelnen Schusses aufgeteilt. Je zwei über Kreuz liegende Explantate wurden zusammen unter normalen (Normoxia) und die beiden anderen Blattstücke unter anaeroben Bedingungen 24 Stunden lang im Tag/Nacht Rhythmus bei 24 °C inkubiert.

Die Proteinextraktion aus transient transformiertem Blattmaterial erfolgte nach Transformationsereignissen und ggf. nach Inkubationsbedingungen getrennt.

2.15.2.3 Proteinextrakt-Herstellung für GUS- und LUC-Aktivitätsmessungen

Das transient transformierte Blattmaterial, das ein Frischgewicht von ca. 0,3 g hatte, wurde in flüssigem Stickstoff mit Mörser und Pistill zerkleinert, in vorgekühlte Eppendorfgefäße überführt und zunächst in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Nach Zugabe von 100 µl Extraktionspuffer [0,1 M NaH₂PO₄ pH 7,8; 1 mM DTT] wurden die Proben auf Eis aufgetaut und gründlich homogenisiert (Vortex). Das Pflanzenmaterial wurde 10 Minuten bei 25500xg und 4 °C pelletiert und der Überstand für quantitative GUS- und LUC-Aktivitätsbestimmungen sowie Proteinkonzentrationsmessungen eingesetzt (Kapitel 2.15.2.4, 2.15.2.5 und 2.13.4).

2.15.2.4 Quantitativer GUS-Test

Die GUS-Aktivitätsmessung erfolgte nach Jefferson (1987) und Jefferson *et al.* (1987). 450 µl GUS-Reaktionspuffer [1 mM 4-Methyl-umbelliferyl-β-D-glucuronid (MUG); 50 mM NaPO₄ pH7,0; 10 mM EDTA; 0,1% (v/v) Triton X-100; 0,1% (v/v) N-Laurylsarkosin; 10 mM β-Mercaptoethanol] wurden auf 37 °C temperiert bevor die Reaktion durch die Zugabe von 50 µl Proteinextrakt (Kapitel 2.15.2.3) und Inkubation bei 37 °C gestartet wurde. Für die Nullwertprobe wurde ein 50 µl Aliquot des Reaktionsansatzes nach einer Minute in 950 µl Stop-Puffer (0,2 M Na₂CO₃) überführt (GUS₀). Weitere Probenentnahmen erfolgten durch Abstoppen der Reaktion nach 20, 40 und 60 Minuten

(GUS₂₀₋₆₀). Im Spektralphotometer (Kontron Instruments SFM 25; Exikation: 365 nm; Emission: 455 nm) wurden in Abhängigkeit der Konzentration an fluoreszierendem Reaktionsprodukt (4-MU) Fluoreszenzeinheiten (FU) pro Zeiteinheit gemessen. Durch Umrechnung und Standardisierung konnte auf die β -Glucuronidaseaktivität geschlossen werden (Kapitel 2.15.2.6).

2.15.2.5 Quantitativer LUC-Test

Die Luciferase-Aktivität wurde nach de Wet *et al.* (1987) bestimmt. 50 μ l des Proteinextraktes (Kapitel 2.15.2.3) wurden zu 350 μ l Luciferasepuffer (25 mM Glycylglycin ; 15 mM MgSO₄ ; 1 mM ATP pH 7,8) hinzugefügt. Nach Injektion von 150 μ l Substratlösung (0,2 mM Luciferin in 25 mM Glycylglycin pH 7,8) wurden im Luminometer (Berthold Lumat 9501) die emittierten Photonen über ein Zeitintervall von 10 Sekunden gezählt und in LUC-Einheiten angegeben.

2.15.2.6 Berechnung der Reportergen-Aktivität

Die Bestimmung der relativen GUS-Aktivität erfolgte modifiziert nach Sprenger-Haussels und Weisshaar (2000) sowie Schledzewski und Mendel (1994). Die spezifische LUC-Aktivität (LUC') wurde als LUC Einheit bezogen auf die Proteinmenge angegeben, wobei anschließend die spezifische LUC-Aktivität der nicht transformierten Kontrolle subtrahiert wurde (LUC'_{kor.}). Durch Division der einzelnen LUC'_{kor.} Werte durch die höchste korrigierte spezifische LUC-Aktivität einer Messreihe wurden relative LUC-Einheiten (RLU) erhalten. Diese Faktoren wurden später als Maß für die Transformationseffizienz zur Korrektur der berechneten GUS-Aktivität herangezogen. Von jedem GUS-Fluoreszenzwert der unterschiedlichen Reaktionszeiten (GUS₂₀, GUS₄₀ und GUS₆₀) wurde der Nullwert des entsprechenden Proteinextraktes (GUS₀) subtrahiert, die Fluoreszenzeinheiten pro Minute bestimmt und anschließend auf die enthaltene Proteinmenge bezogen (FU_{rel} [FU*min⁻¹*mg⁻¹ Protein]). Von diesen FU_{rel}-Werten wurde der Wert der unbeschossenen Kontrolle abgezogen und es resultierte FU_{kor.}. Da 300 FU einer 4-MU Konzentration von 10 nM entsprechen (Bülow, pers. Mitteilung), mussten die korrigierten relativen Fluoreszenzwerte mit dem Faktor 1/30 multipliziert werden, um den enzymatischen Substratumsatz in [pmol 4-MU*min⁻¹*mg⁻¹ Protein] anzugeben (GUS). Durch Multiplikation des Substratumsatzes mit dem jeweiligen relativen LUC-Faktor (RLU) erhielt man standardisierte GUS-Aktivitätswerte (GUS'), die untereinander vergleichbar sind. Es wurden Durchschnittswerte und Standardabweichungen der einzelnen Cotransformations-Experimente ermittelt.

2.16 Stabile Transformation von Tomate

Die Transformation von *Lycopersicon esculentum* erfolgte durch Cokultivierung von Kotyledonen mit rekombinanten *Agrobacterium tumefaciens* Stämmen EHA 101 (Pfitzner, 1998; Hood *et al.*, 1993). Folgende Promotor-Reportergen Konstrukte wurden über binäre Vektoren stabil in Tomate eingebracht: 35S-GUS (Bülow *et al.*, 1999) und *GapC4*-GUS (Köhler *et al.*, 1996).

Zunächst wurden die Tomatensamen von *Lycopersicon esculentum* cv. Mirco-Tom durch 30-sekündige Behandlung mit Ethanol und 20-minütiges Baden in NaOCl/Tween-20 Lösung (1,5% NaOCl; 0,1% Tween-20) sterilisiert. Nach drei Waschschritten in sterilem ddH₂O wurden die Samen auf Keimmedium (4,6 g/l Murashige-Skoog (MS) Salze pH 5,7 mit KOH einstellen; 6 g/l Agar) in sterilen Pflanzencontainern (10 x 10 cm; ca. 20 - 30 Samen pro Container) ausgelegt. Zum Keimen wurden die Samen 3 – 5 Tage bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert und anschließend in eine Pflanzenkammer mit 24 °C und einem Tag/Nacht Rhythmus von 14 Stunden Licht und 10 Stunden Dunkelheit transferiert. Für die Transformation wurden Kotyledonen 8 Tage alter Keimlinge eingesetzt. Der Agrobakterienstämme, deren Plasmide pOCA28-35S-GUS bzw. pUK4030 (*GapC4*-GUS) in das Tomatengenom integriert werden sollten, wurden jeweils in 5 ml Min A Medium [10 ml 5x Min A (52,5 g K₂HPO₄; 22,5 g KH₂PO₄; 5 g (NH₄)SO₄; 2,5 g Natriumcitrat ad 1 l ddH₂O) + 40 ml ddH₂O; autoklavieren; 50 µl 20% (w/v) MgSO₄ und 500 µl 20% Glucose (sterilfiltriert); supplementiert mit 100 µg/ml Streptomycin; 100 µg/ml Spectinomycin; 50 µg/ml Kanamycin] inokuliert und bei 30 °C unter Schütteln inkubiert. Nach 48 Stunden wurden die Agrobakterien durch eine 10-minütige Zentrifugation bei 4300xg pelletiert, in 3 ml Induktionsmedium (5 ml 2x MS Salzlösung (9,2 g/l) pH 5,4; 1,25 ml 100 mM NaPO₄ pH 5,4; 5 µl 10 mM Acetosyringonlösung; 10 µl Streptomycin (c=10); 10 µl Spectinomycin; 10 µl Kanamycin (c=50) ad 10 ml ddH₂O) resuspendiert und weitere 12 Stunden bei 30 °C inkubiert. Unterdessen wurden die Kotyledonen geerntet, die Keimblattspitzen abgeschnitten und das verbleibende Blatt senkrecht zur Blattachse geteilt. Die Explantate wurden mit der Blattoberseite nach oben auf MSOZR Medium (MSO Medium mit 5 µM Acetosyringon und 20 mg/l Zeatinribosid) mit 0,6% Agar gelegt. MSO Medium setzt sich aus folgenden Bestandteilen zusammen: 4,6 MS Salze; 30 g/l Saccharose; pH 5,4 mit KOH; autoklavieren; 10 ml/l 100x B5 Vitamine (10 mg Nikotinsäure; 100 mg Thiaminhydrochlorid; 10 mg Pyridoxinhydrochlorid; 1 g Myoinositol ad 100 ml ddH₂O; sterilfiltrieren). Die Tomatenexplantate wurden 12 Stunden lang bei 24 °C und unter Tag/Nacht Bedingungen inkubiert. Schließlich wurden die induzierten Agrobakterien durch Zentrifugation bei 4300xg geerntet, in 3 ml MSO Medium aufgenommen und durch

Zugabe von weiteren 15 ml MSO Medium verdünnt. In dieser Bakteriensuspension wurden die Keimblattstücke 5 Minuten lang gebadet. Überschüssige Flüssigkeit wurde durch kurzes Trocknen der Explantate auf sterilem 3MM Whatmanpapier entfernt bevor das Pflanzenmaterial zurück auf die MSOZR Platten transferiert wurde. Nach einer 2-tägigen Inkubation unter den oben erläuterten Bedingungen in der Pflanzenkammer wurden die Kotyledonen auf selektives Sprossregenerationsmedium (4,6 g/l MS Salze; 30 g/l Saccharose pH 5,7 mit KOH; 6 g/l Agar; autoklavieren; 10 ml/l 100x B5 Vitamine; 20 mg/l Zeatin; 100 mg/l Kanamycin; 500 mg/l Carbenicillin) umgelegt und weiterhin wie oben kultiviert. Die Explantate wurden wöchentlich auf frisches Medium transferiert. Zunächst bildeten sich Kalli, die vereinzelt wurden. Sobald aus Kallusgewebe wachsende Sprosse auftraten, die eine Länge von ca. 1 cm aufwiesen, wurden diese abgeschnitten und auf selektivem Medium zur Wurzelregeneration kultiviert. Die Zusammensetzung des Wurzelmediums entspricht der des Sprossmediums, jedoch ohne Zusatz von Zeatinribosid. Bewurzelte Sprosse wurden in Erde ausgesetzt und im Gewächshaus herangezogen.

2.17 Yeast Two Hybrid System

Die Methode des Yeast Two Hybrid Systems kann für die Identifizierung neuer Proteininteraktionen, die Bestätigung postulierter Interaktionen und die Bestimmung interagierender Domänen eingesetzt werden. Die Methode basiert auf dem modularen Aufbau vieler eukaryotischer Transkriptionsfaktoren. Diese setzen sich einerseits aus einer DNA-Bindungs- und andererseits aus einer Aktivierungsdomäne zusammen, die funktionell und strukturell distinkt sind. Im MATCHMAKER System von CLONTECH wird dieses Prinzip so umgesetzt, dass ein sog. Bait („Köder“) Gen als Fusion mit der GAL4 DNA-Bindungsdomäne (DNA-BD) aus *Saccharomyces cerevisiae* exprimiert wird, während ein anderes Gen oder cDNA-Fragmente (Prey, „Beute“) mit der GAL4 Aktivierungsdomäne (AD) fusioniert werden. Interagieren Bait und Prey Fusionsproteine in einem Hefereporterstamm, geraten DNA-BD und AD in räumliche Nähe zueinander und aktivieren die Transkription der folgenden vier Reportergene: den beiden Nährstoffmarkern *ADE2* und *HIS3* sowie den zwei Enzym codierenden Genen *MEL1* und *lacZ*.

2.17.1 Konstrukte der Yeast Two Hybrid Untersuchungen

Die Plasmidbezeichnungen sowie die entsprechenden Labor-internen DNA-Nummern der Yeast Two Hybrid Konstrukte sind in Tabelle 4, Spalte 1 aufgeführt. Dabei geben die tiefergestellten Zahlen die Aminosäurepositionen der klonierten Proteinbereiche von ABZ1 und ANA an. Die Bait und Prey Fragmente wurden mittels PCR mit den vollständigen cDNA Klonen von ABZ1 und ANA als Template amplifiziert (Kapitel 2.13.1). Die verwendeten Primerpaare sind mit Bezeichnung, Labor-interner DNA-Nummer und Sequenz in Tabelle 4, Spalte 2 und 3 aufgeführt. Die eingeführten Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen, während die cDNA-spezifischen Sequenzbereiche fett gedruckt sind. Die Annealingtemperatur betrug für das ABZ1₄₇₋₁₃₈-Fragment 50 °C, während die Primer zur Amplifikation des ANA₁₋₃₀₁ Konstruktes bei 62 °C und die der ANA₁₋₁₆₆ Sequenz bei 66 °C annealten. Mit Hilfe des T/A Klonierungskits von Invitrogen wurden die PCR-Produkte zunächst in pCR[®]2.1 kloniert, sequenziert, mit den entsprechenden Restriktionsenzymen (siehe Tab. 4, Primersequenz) herausgeschnitten und in pGBKT7 subkloniert. Der Hefeexpressionsvektor pGBKT7 wurde für die Klonierung von ABZ1 mit *Nde*I/*Sma*I gespalten. Die ANA-Konstrukte wurden im *Nde*I/*Sal*I gespaltenen pGBKT7 Vektor mit der DNA-BD fusioniert.

Tab. 4: Yeast Two Hybrid Konstrukte und die zu ihrer Herstellung verwendeten PCR Primer

Plasmid (DNA-Nr.)	PCR-Primer (DNA-Nr.)	Primersequenz
pGBKT7-ABZ1 ₄₇₋₁₃₈ = pGBKT7-ZIP (3348)	5'ZIP- <i>Nde</i> I (3470)	5'-TATACATATGCTTCTGCAAGATTGACAGGGGA-3' <i>Nde</i> I
	74/3' Primer (3469)	5'-ATATCCCGGGTTAAATTTAAACAATCCTG-3' <i>Sma</i> I
pGBKT7-ANA ₁₋₃₀₁ (3391)	ANA-5' <i>Nde</i> I (3496)	5'-TATACATATGAACAAAGGAGCAAACGGAA-3' <i>Nde</i> I
	MT172/3' (3494)	5'-ATATGTCGACTTAGTAAGGTTTTTGCATGTATAGG-3' <i>Sal</i> I
pGBKT7-ANA ₁₋₁₆₆ (3462)	ANA-5' <i>Nde</i> I (3496)	5'-TATACATATGAACAAAGGAGCAAACGGAA-3' <i>Nde</i> I
	ANA-3' <i>Sal</i> I (3497)	5'-TATGTCGACCTATGTGCCTTTCTTGTGTATATTC-3' <i>Sal</i> I

Zur Klonierung der Bait Proteine wurden sowohl die vollständige codierende Sequenz von ANA (pGBKT7-ANA₁₋₃₀₁) als auch verkürzte Proteinbereiche von ABZ1 und ANA mit der GAL4 DNA-Bindungsdomäne fusioniert. So resultierte aus der Deletion der

N-terminalen, basischen Domäne des ABZ1 das Konstrukt pGBKT7-ABZ1₄₇₋₁₃₈, das lediglich den C-terminalen, 92 Aminosäuren langen Leucin-Zipper als Bait enthält. Das verkürzte ANA Konstrukt besteht aus den 166 N-terminalen Aminosäuren von ANA (pGBKT7-ANA₁₋₁₆₆) und verfügt nicht mehr über seine eigene potentielle C-terminale Aktivierungsdomäne.

2.17.2 Herstellung einer cDNA AD Fusionsbank

Für die cDNA Synthese wurde die SMART™ (Switching Mechanism at 5' end of RNA Transcript) Technologie von Clontech angewandt. Dabei wurde nach dem MATCHMAKER Library Construction & Screening Kit Handbuch (PT3529-1) des Herstellers vorgegangen.

Als Ausgangsmaterial wurden 1,15 µg PolyA+ mRNA eingesetzt (Kapitel 2.10.2), die aus 16 Stunden lang anaerob inkubiertem Tomatenpflanzengewebe (Blätter, Stengel, Früchte, Wurzeln) isoliert worden waren. Die cDNA Erststrangsynthese mittels reverser Transkription erfolgte unter Verwendung der MMLV RT (Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase) und eines Random Primers (CDS III/6). Dieser kann an viele unterschiedliche Sequenzen des mRNA Templates hybridisieren, so dass eine cDNA Bank entsteht, die eine Vielzahl an 5'- und 3'-Sequenzen in nahezu gleichen Verhältnissen repräsentiert. Am 3'Ende der cDNA werden aufgrund der terminalen Transferaseaktivität der MMLV RT einige Desoxycytidine angehängt. Durch Basenpaarung des SMART III™ Oligonucleotids, das an seinem 3'Ende eine Oligo(dG) Sequenz enthält, mit dem dC-Bereich entsteht ein verlängertes Template. Die RT füllt das um SMART III™ verlängerte 5'Ende der mRNA bis zum Ende des Oligonucleotids auf. Diese zusätzliche Sequenz dient in der nachfolgenden LD PCR (long distance PCR) als eine der beiden universellen Primerbindungsstellen (SMART III, CDS III), um die cDNA Sequenzen zu amplifizieren. Die Zyklenzahl der LD PCR betrug 23. Nachfolgend wurden die PCR Produkte über eine Säule chromatographisch aufgereinigt. Dadurch wurde auf cDNA Moleküle selektiert, die größer als 200 bp waren.

2.17.3 Screen auf ABZ1-Interaktionspartner

Der Screen der Yeast Two Hybrid Bank auf ABZ1 interagierende Proteine bzw. Domänen erfolgte durch Cotransformation im Wesentlichen gemäß dem MATCHMAKER Library Construction & Screening Kit Handbuch (PT3529-1) von Clontech. Zunächst wurden kompetente AH109 Hefezellen, die bereits das Bait Plasmid pGBKT7-ABZ1₄₇₋₁₃₈ enthielten, vorbereitet (Kapitel 2.17.1 und 2.17.4). Dann wurde die gesamte

doppelsträngige cDNA mit 3 µg *Sma* I-linearisiertem pGADT7-Rec Vektor unter Zugabe von 200 µg denaturierter Heringssperma DNA in 600 µl kompetente Zellen cotransformiert. Reparaturenzyme der Hefe zirkularisieren das GAL4 AD Expressionsplasmid durch Rekombination der cDNA SMART III und CDS III Enden mit homologen Vektorsequenzen. 200 µl Aliquots des Transformationsansatzes wurden auf QDO Platten (Quadruple Dropout Medium: SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp; gemäß „Yeast Protocols Handbook“ von Clontech), die einen Durchmesser von 15 cm hatten, ausplattiert und 5 Tage lang bei 30 °C inkubiert. Um die Transformationseffizienz des cDNA Bankvektors zu überprüfen bzw. die Anzahl der gescreenten cDNA Bankklone zu ermitteln, wurde eine 1:1000 Verdünnung des Transformationsansatzes auf SD/-Leu bzw. SD/-Leu/-Trp ausplattiert. Der pGADT7 Vektor vermittelt Leucin-Prototrophie, während AH109 Hefestämme mit pGBKT7 auf Medium ohne Tryptophan wachsen können. Die fehlenden Aminosäuren Adenin und Histidin selektieren auf Klone, deren Bait und Prey Fusionsproteine interagieren und so die Transkription der Nährstoffreportergene für Adenin und Histidin aktivieren. Als Positivkontrolle wurde ein AH109[pGBKT7-53] Stamm mit pGADT7-Rec und dem SV40 Large T PCR Fragment cotransformiert, während die Transformation des Stammes AH109[pGBKT7-Lam] mit pGADT7-Rec und dem SV40 Large T PCR Fragment als Negativkontrolle diente. Die Kontrolltransformationen erfolgten im kleinen Maßstab, d.h. es wurden 50 µl Zellen mit 250 ng Vektor und 125 ng Fragment cotransformiert.

Da putativ positive Banktransformanten mehr als ein AD cDNA Bank Plasmid enthalten können, wurden die gewachsenen Hefeklone 2-mal erneut auf QDO Medium ausgestrichen. So wurde der Selektionsdruck sowohl auf den Bait und Prey Vektor als auch auf den korrekten Phänotyp aufrechterhalten. Neben der Nährstoffselektion wurde zur Analyse potentieller Proteininteraktionen auch ein quantitativer β -Galactosidase Test durchgeführt (Kapitel 2.17.7).

Um größere Mengen der Prey Plasmide, die mit ABZ1 interagierende Peptide codieren, zu gewinnen, wurden isolierte Hefepasmide durch Hitzeschock in XL1 Blue Zellen transformiert. Dazu wurden 3 µl der Plasmid DNA (Kapitel 2.17.6) und 50 µl kompetente *E. coli* Zellen eingesetzt und auf LB Platten, die mit 100 µg/ml Carbenicillin supplementiert waren, ausplattiert. pGADT7-Rec besitzt nämlich als bakteriellen Selektionsmarker das Ampicillin-Resistenzgen. Die aus *E. coli* aufgereinigten Plasmide wurden für Retransformationen eingesetzt (Kapitel 2.17.5) und ihre cDNA Inserts sequenziert.

Die Nucleotidsequenzen zweier isolierter und aus *E. coli* isolierter Prey-Peptide wurden durch PCR amplifiziert (Kapitel 2.13.1), wobei die Annealingtemperatur 65 °C betrug. Die verwendeten Templates und Primer sind in Tabelle 5 aufgeführt. pGADT7-Rec16 trägt

ein cDNA Insert, das Homologien zu einem IDS4-like Protein aufweist, während pGADT7-Rec42 ein ACC Oxidase Peptid exprimiert. Die PCR-Produkte wurden mittels QIAquick®PCR Purification Kit von Qiagen aufgereinigt und unter Verwendung des HexaLabel™ DNA Labeling Kits von MBI Fermentas radioaktiv markiert. Die Sonden wurden zum Screenen der anaeroben cDNA Bank aus Tomate sowie für Northern Blot Hybridisierungen eingesetzt.

Tab. 5: Template-DNA und PCR Primer, die zur Amplifikation der Nucleotidsequenz der Prey-Peptide eingesetzt wurden

Plasmid (DNA-Nr.)	Primer (DNA-Nr.)	Sequenz
pGADT7-Rec16 (3979)	YTH16-5' (3933)	5'-AAAGAGAGGGTAGCTGAGATG-3'
	YTH16-3' (3934)	5'-TCCATACATTGTCGAGGGCGT-3'
pGADT7-Rec42 (3982)	YTH42-5' (3931)	5'-GGACAATGTGAAGCAGTTCGT-3'
	YTH42-3' (3932)	5'-GGTGGAATGTTACCCCAATGC-3'

2.17.4 Herstellung kompetenter Hefezellen

Kompetente *Saccharomyces cerevisiae* Zellen wurden entsprechend dem „Yeast Protocols Handbook“ der Firma Clontech (PT3024-1) hergestellt.

Eine Einzelkolonie wurde in 1 ml YPDA-Medium (20 g/l Pepton; 10 g/l Hefeextrakt; 2 g/l Adeninhemisulfat pH 6,5; 2% (v/v) Glucose) bzw. SD-Medium (6,7 g/l Yeast nitrogen base without amino acids; 100 ml/l entsprechende 10x Dropout (DO) Lösung pH 5,8; 2% (v/v) Glucose) sorgfältig resuspendiert (Vortex), in 50 ml des entsprechenden Mediums überführt und 16-18 Stunden bei 30 °C unter Schütteln inkubiert. Durch Überimpfen von 20-30 ml der über Nacht Kultur in 300 ml frisches Medium wurde die optische Dichte ($\lambda = 600 \text{ nm}$) dieser Startkultur auf 0,2-0,3 eingestellt. Nach weiteren 4 Stunden Inkubation bei 30 °C sollte die Kultur eine OD₆₀₀ von 0,4-0,6 erreicht haben. Durch 5-minütige Zentrifugation bei 1000xg und Raumtemperatur wurden die Zellen geerntet. Das Pellet wurde durch vorsichtiges Resuspendieren in 25-50 ml ddH₂O gewaschen und erneut zentrifugiert. Schließlich wurden die Hefezellen in 1,5 ml frisch angesetzttem 1x TE/1x LiAc (10x TE: 100 mM Tris-HCl; 10 mM EDTA pH 7,5; 10x LiAc: 1 M Lithiumacetat pH 7,5) aufgenommen. Die Transformation der frischen, kompetenten Hefezellen sollte innerhalb einer Stunde erfolgen.

2.17.5 Hefetransformation

Kompetente *Saccharomyces cerevisiae* Zellen wurden entsprechend dem „Yeast Protocols Handbook“ von Clontech (PT3024-1) transformiert.

Dazu wurden 1 µg des zu transformierenden Plasmids mit 0,1 mg denaturierter Heringssperma DNA und 100 µl kompetenten Hefezellen vereinigt. Nach Zugabe von 600 µl PEG/LiAc Lösung (40% (v/v) PEG 4000; 1x TE; 1x LiAc) folgte 10 Sekunden langes Mischen (Vortex) und eine 30-minütige Inkubation bei 30 °C unter Schütteln. 70 µl zugefügtes DMSO wurden durch Invertieren mit dem Transformationsansatz vermischt bevor die Hefezellen einem 15-minütigen Hitzeschock bei 42 °C ausgesetzt wurden. Der Transformationsansatz wurde 1-2 Minuten auf Eis abgekühlt, die Zellen 5 Sekunden pelletiert, in 500 µl 1x TE resuspendiert und auf entsprechendem Selektionsmedium ausplattiert. Nach 2-4-tägiger Inkubation bei 30 °C traten Transformanten auf.

2.17.6 Plasmidminipräparation aus Hefe (*Saccharomyces cerevisiae*)

Die Plasmidisolierung aus Hefe wurde nach einem Protokoll von Piper (1996) durchgeführt. Die Hefezellen aus insgesamt 3 ml einer über Nacht Kultur wurden pelletiert und in 100 µl LiCl-Triton X-100 Puffer (2,5 M LiCl; 50 mM Tris-HCl pH 8,0; 4% (v/v) Triton X-100; 62,5 mM EDTA) resuspendiert. Zum Zellaufschluß wurden 0,2 g Glasperlen ($\varnothing = 0,45 \mu\text{m}$) und 100 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) zugefügt und zwei Minuten lang gründlich gemischt (Vortex). Nach 1-minütiger Zentrifugation bei 20000xg wurde der Überstand mit 2 Volumen Ethanol versetzt, die DNA 5 Minuten auf Eis präzipitiert und schließlich 10 Minuten bei 20000xg zentrifugiert. Das DNA Pellet wurde mit 70%igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in 20 µl LTE aufgenommen. Abschließend wurde die DNA Konzentration photometrisch bestimmt. Die isolierten Plasmide wurden zur Transformation durch Hitzeschock in *E. coli* Zellen eingesetzt.

2.17.7 Quantitativer β -Galactosidase Test

Die Untersuchungen zur quantitativen β -Galactosidase-Aktivität erfolgten in Flüssigkultur. Als Substrat wurde o-Nitrophenyl- β -D-galactopyranosid (ONPG), das durch β -Galactosidase in o-Nitrophenol und D-Galactose hydrolysiert wird, eingesetzt. Die enzymatische Aktivität wird durch die resultierende Farbreaktion quantifiziert. Das Versuchsvorgehen entsprach im Wesentlichen dem „Yeast Protocols Handbook“ von Clontech.

In 5 ml des entsprechenden SD-Mediums wurden Hefe über Nacht Kulturen inokuliert und bei 30 °C unter Schütteln inkubiert. Ein Aliquot der über Nacht Kultur wurde in frisches Selektivmedium überführt, so dass eine optische Dichte bei 600 nm von 0,2-0,3 gemessen wurde. Die frische Kultur wurde weiterhin bei 30 °C inkubiert bis sie eine OD₆₀₀ zwischen 0,5 und 0,8 aufwies und die exakte optische Dichte wurde notiert. Es wurden 3x 1,5 ml der Kultur abgenommen und die Hefezellen durch eine 1-minütige Zentrifugation bei 20000xg geerntet, jeweils mit 1,5 ml Z-Puffer (16,1 g Na₂HPO₄*7H₂O; 5,5 g NaH₂PO₄*H₂O; 0,75 g KCl; 0,246 g MgSO₄*7H₂O pH 7,0 ad 1000 ml ddH₂O) durch Mischen (Vortex) und erneute Zentrifugation gewaschen und schließlich in je 300 µl Z-Puffer resuspendiert, wodurch eine 5-fache Aufkonzentrierung der Zelldichte erfolgte. 100 µl der Zellsuspension wurden abgenommen und die Hefezellen durch 3-maliges Einfrieren in flüssigem Stickstoff und Auftauen im 37 °C Wasserbad aufgeschlossen. Als Nullwertprobe wurden 100 µl Z-Puffer nachfolgend wie die Proben behandelt. Nach Zugabe von 700 µl Z-Puffer mit 37,8 mM β-Mercaptoethanol wurde begonnen die Reaktionszeit zu messen. Sofort wurden 160 µl ONPG in Z-Puffer (4 mg/ml) zu den Reaktionen und Blindproben zugefügt und bei 30 °C inkubiert bis eine Gelbfärbung der Reaktionen auftrat. Solche Reaktionsansätze sowie jeweils eine Blindprobe wurden durch Zugabe von 400 µl 1M Na₂CO₃ abgestoppt und die Reaktionsdauer vermerkt. Zum Entfernen der Zelldebris schloss sich eine 10-minütige Zentrifugation bei 20000xg an. Nachfolgend wurden die Proben bei einer Wellenlänge von 420 nm in Einmalplastikküvetten gegen die Blindprobe vermessen. Die Berechnung der β-Galactosidaseeinheiten erfolgte nach der Formel:

$$\beta\text{-Galactosidaseeinheit} = (1000 \times \text{OD}_{420}) / (t \times V \times \text{OD}_{600})$$

t: Reaktionszeit [min]; V: 0,1 ml x Konzentrierungsfaktor (5)

Die Berechnung der Mittelwerte und Standardabweichungen der analysierten Interaktionen basiert auf mindestens 6, aber höchstens 9 Messwerten.

2.18 Computer-gestützte Analysen

Sofern *in silico* Analysen online durchgeführt wurden, sind die entsprechenden Links der verwendeten Programme nachfolgend aufgeführt. Homologievergleiche wurden mit Hilfe des Blast Programmes der NCBI Datenbank durchgeführt (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>), wobei Nucleotidsequenzen mit blastn oder blastx und Aminosäuresequenzen mit blastp bearbeitet wurden (Altschul *et al.*, 1997). Durch

einen Blast Homologievergleich in der TAIR Datenbank (<http://www.arabidopsis.org/Blast>) wurden IDS4-like Homologe aus *Arabidopsis thaliana* identifiziert. Durch ihre verlinkte Locus Bezeichnung kann mit Hilfe des TAIR Expression Viewers das Expressionsprofil bei abiotischem Stress, sofern vorhanden, eingesehen werden. Die Identifizierung von Signalpeptiden innerhalb der Aminosäuresequenzen von ABZ1 und ANA erfolgte durch das Computerprogramm Scanprosite (<http://us.expasy.org/tools/scanprosite>). Um Voraussagen über die subzelluläre Lokalisierung von ABZ1 und ANA treffen zu können, wurden ihre Aminosäuresequenzen mittels Psort untersucht (<http://psort.nibb.ac.jp/form.html>). Multiple Alignments wurden mit ClustalW durchgeführt (<http://www.ch.embnet.org/software/ClustaW.html>), während für die Erstellung des phylogenetischen Stammbaumes von ABZ1 das Programm ClustalX in der Version 1.81 eingesetzt wurde (Thompson *et al.*, 1997). Mit Hilfe des Programmes DNA Strider™ 1.3f15 konnte sowohl das theoretische Molekulargewicht als auch der pKi-Wert anhand von Aminosäuresequenzen bestimmt werden.

3. Ergebnisse

3.1 Anaerob exprimierte Gene aus der Tomate

Um differentiell exprimierte Gene zu identifizieren, wurde die Methode der „Suppression Subtractive Hybridization“ (SSH) angewandt (Kapitel 2.11). Dabei war das Ziel Gene zu identifizieren, die, im Vergleich zu Pflanzen, die unter normalen Sauerstoffbedingungen gehalten wurden, ausschließlich bzw. deutlich stärker unter Anaerobiose exprimiert werden. Diese Gene werden nachfolgend als forward subtrahiert bezeichnet, während reverse subtrahierte Gene unter aeroben, aber nicht unter anaeroben Bedingungen exprimiert werden.

Um anaerob spezifische cDNA Fragmente zu identifizieren, wurden die forward subtrahierten cDNA Fragmente der SSH in pCR®2.1 kloniert. Die isolierte Plasmid-DNA wurde mit *RsaI* gespalten und die Restriktionsansätze in Duplika-Agarosegelen aufgetrennt und geblottet. Die Nylonmembranen, auf denen die *RsaI* Fragmente fixiert vorlagen, wurden mit der Gesamtheit einerseits der forward subtrahierten und andererseits der reverse subtrahierten cDNA Fragmente hybridisiert (Kapitel 2.11).

In Abbildung 2 sind exemplarisch die Autoradiogramme der Southern Blots einiger anaerob spezifischer cDNA Fragmente der Forward Subtraktion nach Hybridisierung mit den forward und reverse subtrahierten cDNA Fragmenten dargestellt. Von 238 untersuchten Klonen enthielten 81 forward spezifisch hybridisierende Fragmente. Nach Sequenzierung aller 81 Fragmente wurden 46 unterschiedliche SSH Fragmente identifiziert. 16 unterschiedlichen SSH Fragmenten, wovon ein Fragment viermal und 2 Fragmente doppelt isoliert wurden, konnte keine Funktion zugeordnet werden. Von den verbleibenden 30 Fragmenten erwiesen sich 5 als *RsaI* Fragmente, die Homologien zu Genen zeigten, zu denen andere Fragmente ebenfalls homolog waren, und die möglicherweise unterschiedliche SSH Fragmente der gleichen cDNA sind.

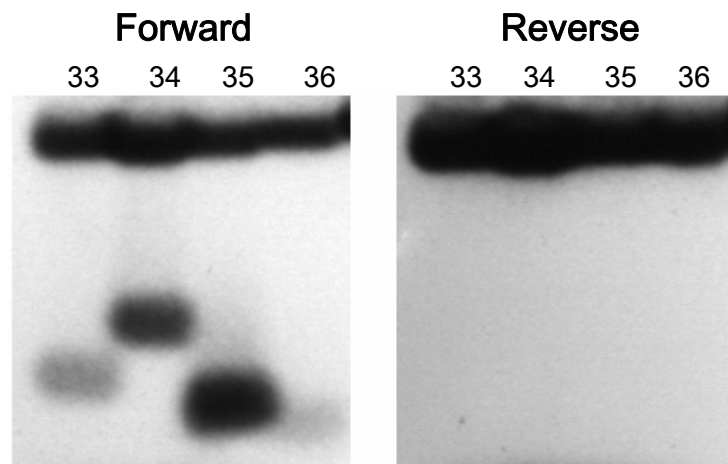


Abb. 2: Autoradiogramm eines Southern Blots der forward subtrahierten SSH Fragmente 33-36. Die *Rsa*I gespaltenen, rekombinanten Plasmide wurden einerseits mit dem cDNA Pool der Forward Subtraktion (Forward) und andererseits mit den cDNA Fragmenten der Reverse Subtraktion (Reverse) hybridisiert.

In Tabelle 6 sind die differentiell hybridisierenden SSH Fragmente der Forward Subtraktion mit ihrer Labor-internen Fragment-Nummer (Spalte 1), der Angabe, wieviele identische Fragmente bzw. Fragmente eines Gens identifiziert wurden (Spalte 2) und die Ergebnisse des Homologievergleichs, inklusive der Accession Number derjenigen Homologen, die die höchste Sequenzidentität aufwiesen (Spalte 3), wiedergegeben. Es sind nur die 25 cDNA Fragmente aufgeführt, denen aufgrund der Datenbank-Recherche eine putative Funktion zugeordnet werden konnte.

Tab. 6: Durch Suppression Subtractive Hybridization isolierte cDNA Fragmente (SSH + Klon Nr.) anaerob induzierter Gene, die Häufigkeit, mit der sie isoliert wurden, und ihre höchsten Homologien

SSH Fragment	Anzahl	Homologievergleich
SSH 6	3	Pyruvat Decarboxylase (<i>Solanum tuberosum</i>); BAC23043
SSH 7	2	dnaK-Typ molekulares Chaperon hsc70-3 (<i>Lycopersicon esculentum</i>); JC4786
SSH 11	10	NADH-abhängige Glutamatsynthase (<i>Arabidopsis thaliana</i>); BAA97323.1
SSH 33	1	Glycerinaldehyd 3-Phosphat Dehydrogenase (<i>Lycopersicon esculentum</i>); AAB54003
SSH 34	3	Samen spezifisches Protein Bn15D17A (<i>Brassica napus</i>); AAP37970
SSH 35	6	Ethylen-responsives Protein (<i>Arabidopsis thaliana</i>); NP_850562.1
SSH 36	4	PHO85-ähnliches Protein (<i>Oryza sativa</i>); BAD01222.1

SSH 55	4	Heat shock Protein 90 (<i>Lycopersicon esculentum</i>); AAD30456
SSH 59	3	Triosephosphat-Isomerase (<i>Petunia x hybrida</i>); CAA58230
SSH 61	2	Sucrose Synthase (<i>Lycopersicon esculentum</i>); CAA09681
SSH 62	3	Enolase (<i>Lycopersicon esculentum</i>); CAA41115
SSH 73	1	Phosphoenolpyruvat Carboxykinase (<i>Lycopersicon esculentum</i>); AAG01894
SSH 74	1	bZIP Transkriptionsfaktor BZI-4 (<i>Nicotiana tabacum</i>); AAK92215
SSH 76	1	Calmodulin bindendes Protein TCB60 (<i>Nicotiana tabacum</i>); T03793
SSH 87	1	Seneszenz-assoziiertes Protein (<i>Arabidopsis thaliana</i>); AAM64406
SSH 88	1	Protein der Aldo/Keto Reduktase Familie (<i>Arabidopsis thaliana</i>); AAB71981
SSH 101	1	Heat shock Protein 70 (<i>Lycopersicon esculentum</i>); L41253
SSH 106	1	Proteinkinase (<i>Malus x domestica</i>); AAQ54539.1
SSH 122	2	Sucrose Synthase (<i>Lycopersicon esculentum</i>); AAA34196
SSH 126	2	Heat shock Protein 70 (<i>Salix gilgiana</i>); BAA34919
SSH 136	3	Putativer Xyloglucan Inhibitor (<i>Lycopersicon esculentum</i>); AAN87262.1
SSH 143	1	Delta-Tonoplast intrinsisches Protein (<i>Gossypium hirsutum</i>); AAB04557.1
SSH 172	2	Putatives NAC Domänen Protein (<i>Solanum tuberosum</i>); CAC42087
SSH 174	1	Zink Finger (C3HC4-Typ RING Finger) Protein (<i>Arabidopsis thaliana</i>); NP_568264
SSH 224	1	Kälte induzierte Glucosyltransferase (<i>Solanum soganardium</i>); AAK54465

Alle SSH Fragmente, deren abgeleitete Aminosäuresequenzen Homologien zu Proteinen aus der Tomate zeigen, können aufgrund der Identität der Nucleotidsequenz zwischen SSH Fragment und homologem Tomatengen von > 97% als Fragmente dieser entsprechenden Gene bezeichnet werden (SSH 7, 33, 55, 61, 62, 73, 101 und 136). Lediglich das Fragment SSH 122 ist offensichtlich nur ein Homolog des aufgeführten Saccharose Synthase Gens.

Zusammenfassend wird festgestellt, dass ein Großteil der isolierten SSH Fragmente Homologien zu Genen aufweisen, die Enzyme des Kohlenstoff-Metabolismus codieren (SSH 6, 11, 33, 59, 61, 62, 73, 88, 122 und 224). Von diesen sind die Enzyme, die Homologe zu den SSH-Fragmenten 6, 33, 62 und 59 darstellen, an der alkoholischen Gärung beteiligt. Die Heat-shock Protein Homologen sind als Chaperone in die Proteinsynthese involviert (SSH 7, 55, 101 und 126). Besonderes Interesse gilt den SSH Fragmenten, deren Homologe eine putative Funktion in der anaeroben Genregulation

und Signaltransduktion haben (SSH 35, 36, 74, 76, 106, 143, 172 und 174). Da SSH 74 und 172 homolog zu Transkriptionsfaktoren der bZIP Familie bzw. zu solchen mit einer sog. NAC Domäne sind, wurden sie in dieser Arbeit näher analysiert.

3.1.1 Untersuchung der transkriptionellen Induktion einiger differentiell exprimierter Gene unter Anaerobiose

Einige Gene, die anhand ihrer isolierten SSH Fragmente identifiziert werden konnten, wurden durch Northern Blot Analysen auf ihre anaerob spezifische Expression überprüft. Gesamt-RNA, die aus einem Gewebegemisch aus aeroben und anaerob inkubierten Tomatenpflanzen isoliert worden war, wurde mit den cDNA Fragmenten SSH 11, SSH 33, SSH 76, SSH 84 und SSH 143 hybridisiert (Tab. 6; Kapitel 2.10.4). Das SSH-Fragment 84 zeigt Homologie zu einem exprimierten Protein aus Arabidopsis mit unbekannter Funktion und ist deshalb nicht in Tabelle 6 aufgeführt. Die transkriptionelle Induktion des bZIP Transkriptionsfaktors (SSH 74), des Ethylen-responsiven Proteins (SSH 35) sowie des Proteins mit NAC Domäne (SSH 172) wurden durch Hybridisierung gewebespezifischer Northern Blots mit den entsprechenden *RsaI* Fragmenten analysiert. Dazu erfolgte die RNA Isolierung aus aeroben und anaerob inkubierten Tomatenpflanzen nach Gewebetypen getrennt (Früchte, Blätter, Wurzeln).

Abbildung 3 zeigt, dass alle untersuchten Gene, im Vergleich zu ihrer Expressionsstärke unter aeroben Bedingungen, ausschließlich oder deutlich stärker unter Anaerobiose exprimiert werden. Die Expression des bZIP Faktor codierenden Gens (SSH 74) wird in allen drei untersuchten, anaerob inkubierten Gewebetypen gleich stark induziert. Für das Gen, das ein Ethylen-responsives Protein codiert (SSH 35), wird unter anaeroben Bedingungen in den Früchten die größte Transkriptmenge beobachtet. Blatt- und Wurzelgewebe zeigen eine geringere Expressionsstärke des Ethylen-responsiven Gens. Das Gen, das ein Protein mit NAC-Domäne codiert (SSH 172), wird hauptsächlich in anaerob inkubiertem Blattgewebe exprimiert, während in den Früchten und Wurzeln unter Anaerobiose eine relativ geringe Transkriptmenge detektiert wird. Dadurch konnte gezeigt werden, dass die forward subtrahierten SSH Fragmente, die durch Northern Blot Hybridisierung untersucht wurden, tatsächlich auf anaerob induzierte Gene zurückzuführen sind.

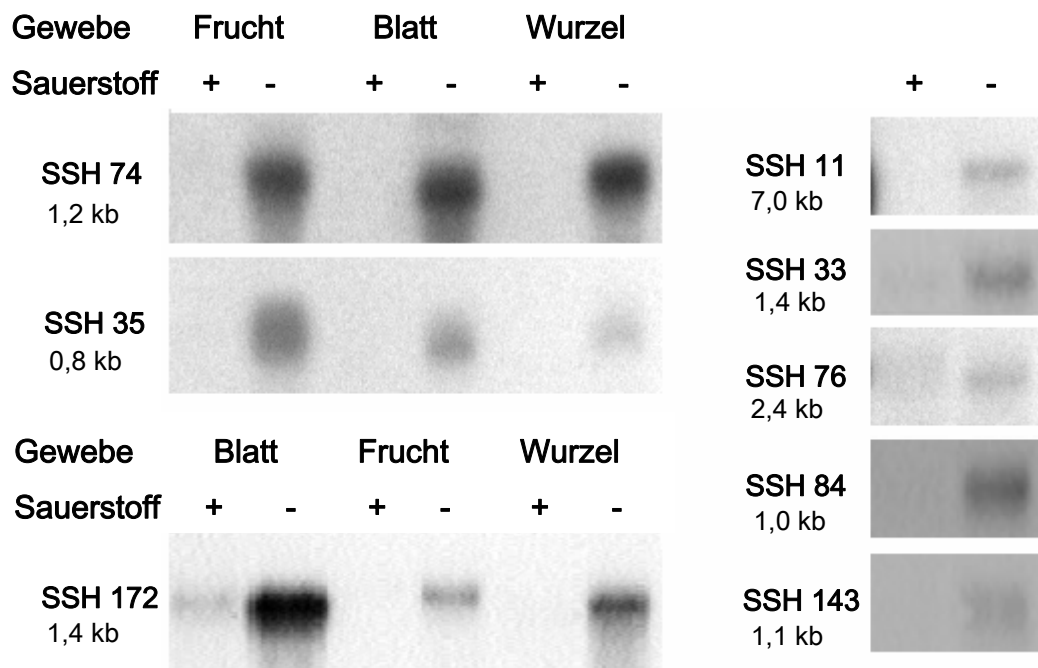


Abb. 3: Transkriptionelle Analyse der anaeroben Induktion forward subtrahierter Gene. Gesamt-RNA aus unterschiedlichen Geweben (Blatt, Frucht, Wurzel) bzw. einem Gemisch aller Gewebe (rechts) aerober (+) und anaerob (-) inkubierter Tomatenpflanzen wurde mit entsprechenden SSH Fragmenten hybridisiert. Die Größe der hybridisierten mRNA-Moleküle ist in Kilobasenpaaren [kb] angegeben. Die aufgetragenen RNA-Mengen wurden durch Ethidiumbromid-Färbung der rRNA überprüft und waren vergleichbar (Daten nicht gezeigt).

Ziel dieser Arbeit ist die Untersuchung von Komponenten der anaeroben Genexpression und Signaltransduktion. Deshalb wurden, basierend auf den isolierten SSH Fragmenten SSH 74 und SSH 172, die beiden anaerob induzierten Gene näher untersucht, die für einen bZIP Transkriptionsfaktor (SSH 74) sowie einen Transkriptionsfaktor mit NAC Domäne (SSH 172) codieren. Nachfolgend werden diese Gene mit *Abz1* und *Ana* bzw. ihre Genprodukte als ABZ1 für anaerob induzierter bZIP Faktor und ANA für anaerob induziertes NAC Protein bezeichnet.

3.2 Strukturelle und funktionelle Analyse von ANA

3.2.1 ANA gehört zur Familie der NAC Transkriptionsfaktoren

Transkriptionsfaktoren werden aufgrund ihrer Domänen, die an spezifische DNA-Sequenzen binden, in unterschiedliche Klassen eingeteilt. Eine solche DNA-bindende Domäne stellt die hoch konservierte N-terminale Aminosäuresequenz der sog. NAC Proteine dar. Gene, die Proteine mit NAC Domäne codieren, spielen eine essentielle

Rolle in der Pflanzenentwicklung und sind für die Bildung und Erhaltung des SAM (Shoot Apical Meristem) sowie für die Blütenmorphogenese verantwortlich (Souer *et al.*, 1996). Entdeckt wurde diese Genklasse durch Mutanten der Petunie, die kein Apikalmeristem (*nam*, no apical meristem; Souer *et al.*, 1996) ausbilden und Arabidopsis-Mutanten, die fusionierte Kotyledonen zeigen (*cuc1* und *cuc2*, cup-shaped cotyledon; Aida *et al.*, 1997). In Folge der Identifizierung eines cDNA Fragments, das Homologien zur mRNA eines Proteins mit NAC-Domäne aufweist (Tab. 6; SSH 172), wurde zunächst ein vollständiger cDNA Klon für ANA isoliert werden. So wurden Sequenzinformationen über den codierenden Bereich des ANA Proteins sowie seine 5'- und 3'-UTR (untranslated region) erhalten.

Es wurden ca. 200000 Klone einer cDNA Bank (5×10^5 cfu/ml) aus anaerob inkubierten Tomatenpflanzen (Kapitel 2.12) mit dem isolierten cDNA Fragment SSH 172 als Hybridisierungssonde gescreent. Im ersten Screen konnten 85 potentiell Positive detektiert werden. 10 dieser positiven Klone wurden in einer zweiten Screeningrunde vereinzelt und verifiziert. Nach einer *NotI/SalI*-Testspaltung der isolierten Plasmid-DNA wurde ein Klon mit einem möglichst großen cDNA Insert identifiziert und sequenziert.

Abbildung 4 zeigt die isolierte cDNA Sequenz, die 1309 Basenpaare umfasst, wovon 22 Adeninreste den PolyA-Schwanz bilden. 903 Basenpaare (138–1040) werden in ein 301 Aminosäuren großes Protein translatiert (ANA). Mit Hilfe des entsprechenden DNA Strider™ 1.3f15 Computer-Tools konnte das theoretische Molekulargewicht von ANA mit 34,8 kDa und sein p*K*_i-Wert mit 8,22 bestimmt werden. Die 5'UTR besteht aus 137 Basenpaaren, während sich die 3'UTR aus 269 Basenpaaren zusammensetzt. Das SSH Fragment ist 355 Basenpaare lang (802–1156; unterstrichene Nucleotidsequenz) und entspricht den C-terminalen 239 Basenpaaren der codierenden Sequenz und den in 3'Richtung angrenzenden 116 Basenpaaren der nicht translatierten Region.

Mittels BLAST Search wurde ein Homologievergleich der ANA codierenden Sequenz sowohl auf Nucleotid- als auch auf Aminosäureebene durchgeführt. Diese Analyse bestätigte das Ergebnis des mit dem SSH Fragment 172 durchgeführten Homologievergleichs (Kapitel 3.1). Die 301 Aminosäuren lange Sequenz weist eine 97%ige Identität zu einem putativen Protein mit NAC Domäne aus *Solanum tuberosum* auf (Collinge und Boller, 2001; Accession number CAC42087.1).

Abbildung 4 stellt außerdem den aus der Aminosäuresequenz resultierenden strukturellen Aufbau von ANA dar. Die NAC Domäne befindet sich im N-terminalen Bereich des ANA (Fettdruck), umfasst die Aminosäuren 11 bis einschließlich 164 und kann in fünf hoch konservierte Subdomänen (Farbdruck) unterteilt werden (Collinge und Boller, 2001). In einem DNA-Bindungsaktivitätstest in Hefe konnten Duval *et al.* (2002)

zeigen, dass das NAC Protein AtNAM aus *Arabidopsis thaliana* eine DNA-Bindungsdomäne innerhalb der beiden letzten Subdomänen (blau und grün) enthält.

Da Duval *et al.* (2002), Xie *et al.* (2000) und Ren *et al.* (2000) eine Aktivierung der Reportergenexpression durch carboxyterminale Bereiche von NAC Proteinen in Hefe nachweisen konnten, wird angenommen, dass der C-Terminus von ANA eine transkriptionelle Aktivierungsdomäne besitzen könnte (Kursivdruck).

Obwohl ANA als Mitglied der NAC Familie potentiell als Transkriptionsfaktor im Zellkern aktiv ist, konnte weder mit dem Programm Psort noch mit ScanProsite der SwissProt Datenbank ein Signalpeptid zur Kernlokalisierung detektiert werden.

```

1                                     GAAACTAACACAAAGCA
18  GGAGCAGGAGCAGCAACAAACAGAGAGAAGAAAACAGAGGAAGATAAGAGGAAAATTTAT
78  CGAATTCGAATCGAGAGAAAAGGGGAAGTGAAGTTGCGAAGAGTGAGAATTTCAAAGGAA
138 ATGAACAAAGGAGCAACGGAATCAGCAATTGGAGTTACCGGCGGGATTGAGATTCAT
1   M N K G A N G N Q Q L E L P A G F R F H
198 CCGACAGACGACGAATTGGTGCAGCACTATCTCTGCAGGAAATGCGCCGACAGTCGATT
21  P T D D E L V Q H Y L C R K C A G Q S I
258 GCTGTATCAATTATAGCTGAAATTGATCTTTACAAGTTGATCCATGGCAGTTGCCTGAG
41  A V S I I A E I D L Y K F D P W Q L P E
318 AAGGCTTTGTACGGTGAAAAAGAGTGGTATTTTTTCTACCAAGGGATAGAAAATATCCG
61  K A L Y G E K E W Y F F S P R D R K Y P
378 AACGGTTCACGGCCGAACCGAGCAGCAGGAACCGTTATTGGAAGGCAACCGGAGCTGAT
81  N G S R P N R A A G T G Y W K A T G A D
438 AAACCGGTGGGAAAACCCAAACCTTAGGGATAAAGAAGGCACTTGTGTCTATGCCGGA
101 K P V G K P K T L G I K K A L V F Y A G
498 AAAGCACCCAGAGGTATAAAAACAAATTGGATTATGCACGAGTACCGCCTCGCCAACGTG
121 K A P R G I K T N W I M H E Y R L A N V
558 GACCGCTCTGCTGGCAAGAACAATAACTTGAGGCTTGATGATTGGGTATTGTGTGCAATA
141 D R S A A G K N N N L R L D D W V L C R I
618 TACAACAAGAAAGGCACACTTGAGAAGCATTACAATGTGGACAACAAGGAAACTACAAGC
161 Y N K K G T L E K H Y N V D N K E T T S
678 TTTGGAGAATTTGATGAAGAAATAAAACCAAAATATTGCCACACAATTAGCACCGATG
181 F G E F D E E I K P K I L P T Q L A P M
738 CCACCACGGCCTCGATCGACACCAGCAAACGACTACTTTTATTTTCGAGTCATCAGAGTCG
201 P P R P R S T P A N D Y F Y F E S S E S
798 ATGACTAGAATGCACACGACAACTCGAGCTCTGGCTCAGAGCATGTCTTGTCGCCATGT
221 M T R M H T T N S S S G S E H V L S P C
858 GACAAGGAGTTTCAGAGCGCGCCCAATGGGACGAAGACCACAGAAACCCCTTGATTTT
241 D K E V Q S A P K W D E D H R N T L D F
918 CAGCTAACTATTTGGATGGTTTACTAAATGAACCATTGAAACCCAAATGCAGCAGCAA
261 Q L N Y L D G L L N E P F E T Q M Q Q Q
978 ATTTGCAACTTTGACCAGTTCAACAATTTCCAAGACATGTTCTATACATGCAAAAACCT
281 I C N F D Q F N N F Q D M F L Y M Q K P
1038 TACTAAAATTGTATAAATTCATTGGATCTAAATTGAGTGTGATCCATGACATTTTCTTTG
301 Y *
1098 TTCTTTGGTGGTGTAGGTCAACTTTTTATTAAGTAGTTTAGAGAAGTACAAAATGCTAGT
1158 CAAATTTGGTGGGCTACAGCACAATGAGCCTTGATAAGCATAGCCAAAGAGTCGTATAG
1218 AAGGGCTTATTATTATTGTAAGGTATGTAAAAACAAATGAAAATTTGTTAATATCAAGTT
1278 ATCATTCTTCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

```

Abb. 4: Nucleotid- und daraus abgeleitete Aminosäuresequenz sowie die Domänenstruktur von ANA. Das SSH Fragment (unterstrichene Nucleotidsequenz), die NAC-Domäne (Fettdruck) mit ihren fünf konservierten Subdomänen (gelb, orange, rot, blau, grün) und die potentielle Aktivierungsdomäne (Kursivdruck) sind gekennzeichnet.

3.2.2 ANA wird in den Nucleus transportiert

Das ANA Protein ist aufgrund seiner Sequenzanalyse ein potentieller Transkriptionsfaktor (Kapitel 3.2.1). Obwohl Transkriptionsfaktoren funktionell im Zellkern aktiv sind, konnte durch *in silico* Analyse der Aminosäuresequenz von ANA kein Kernlokalisierungssignal detektiert werden. Deshalb wurde in einem transienten Experiment untersucht, ob ANA dennoch in den Zellkern transportiert wird.

Zunächst wurden drei unterschiedlich große Bereiche der ANA codierenden Sequenz translational mit dem β -Glucuronidasegen des pRT103-GUS Vektors fusioniert (Kapitel 2.15.1.1). Nach transienter Transformation dieser Konstrukte mit der Partikelkanone in Zwiebelepidermiszellen wurden folglich ANA-GUS-Fusionsproteine exprimiert (Kapitel 2.15.1.2). Das Konstrukt ANA₁₋₃₀₁-GUS enthält neben dem β -Glucuronidasegen die gesamte codierende ANA Sequenz, während die Konstrukte ANA₁₋₁₃₆-GUS bzw. ANA₁₋₇₆-GUS C-terminale Deletionskonstrukte des ANA darstellen. Der Blast Homologievergleich für ANA ergab eine konservierte NAM Domäne im Bereich der Aminosäuren 13 bis 138. Unter Berücksichtigung des Primerdesigns zur Amplifikation der ANA-NAM Domäne, wurde der N-Terminus von Aminosäure 1 bis 136 mit dem GUS-Gen translational fusioniert (ANA₁₋₁₃₆-GUS). Zur Kontrolle auf nicht vorhandene Kernlokalisierung wurde pRT103-GUS transformiert. Nach GUS-Anfärbung der transformierten Zwiebelepidermiszellen konnte die Lokalisierung der Fusionsproteine im Mikroskop festgestellt und aufgenommen werden (Kapitel 2.15.1.3). Durch eine zusätzliche DAPI-Färbung und Anregung des Fluorochroms bei einer Wellenlänge von 360-370 nm wurden die Zellkerne nachgewiesen, um eine eventuelle Lokalisierung der Fusionsproteine im Zellkern zu bestätigen.

Abbildung 5 zeigt, dass das GUS-Protein allein zu einer gleichmäßigen Verteilung der GUS-Färbung innerhalb des Cytoplasmas führt. Nach Transformation der beiden ANA-Deletionskonstrukte, die GUS-Fusionsproteine mit 76 (ANA₁₋₇₆-GUS) bzw. 136 (ANA₁₋₁₃₆-GUS) N-terminalen Aminosäuren des ANA exprimieren, wird, wie bei der Negativkontrolle (GUS), eine cytoplasmatische GUS-Färbung beobachtet. Wird jedoch eine mit ANA₁₋₃₀₁-GUS transformierte Epidermiszelle betrachtet, so fällt zusätzlich zur cytoplasmatischen GUS-Färbung eine Konzentrierung des Fusionsproteins im Zellkern auf. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass ANA im N-terminalen Bereich bis einschließlich Aminosäure 136 kein Signalpeptid besitzt, das für eine Kernlokalisierung ausreichend wäre. Diese Beobachtung deckt sich mit dem Ergebnis der *in silico* Analyse von ANA auf ein Signalpeptid zur Kernlokalisierung. Ausschließlich das gesamte 301 Aminosäuren umfassende ANA-Protein ist in der Lage in den Zellkern zu gelangen. Diese Beobachtung lässt darauf schließen, dass im C-terminalen Bereich zwischen

Aminosäure 137 und 301 ein untypisches Kernlokalisierungssignal vorliegt, das nicht durch Computerprogramme identifiziert werden konnte. Der nur teilweise Transport von ANA in den Nucleus deutet möglicherweise darauf hin, dass anaerobe Bedingungen oder andere Proteine nötig sind, um ANA vollständig in den Zellkern zu transportieren.

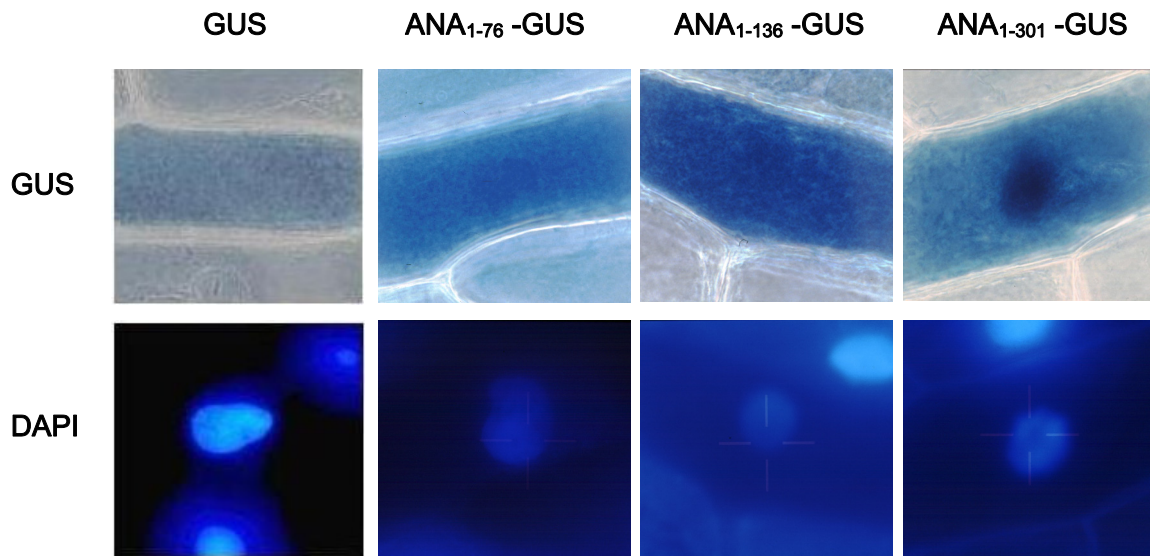


Abb. 5: Untersuchungen zur Kernlokalisierung von ANA. GUS- und DAPI-Anfärbung von Zwiebelepidermiszellen nach transienter Expression unterschiedlicher ANA-GUS-Fusionsproteine. Die tiefergestellten Zahlen innerhalb der Konstruktbezeichnungen geben die klonierte ANA-Sequenz in Aminosäuren wieder. Die Negativkontrolle exprimiert β -Glucuronidase alleine (GUS). Die Transformation erfolgte durch Goldpartikelbeschuss mit der Partikelkanone.

3.2.3 ANA besitzt eine Transkriptionsaktivierungsdomäne

Die meisten bisher funktionell untersuchten pflanzlichen Proteine, die eine NAC Domäne besitzen, wirken als Transkriptionsaktivatoren (Duval *et al.*, 2002; Xie *et al.*, 2000; Ren *et al.*, 2000). Diese Faktoren tragen ihre transaktivierende Domäne im C-Terminus. Aufgrund dieser Vorkenntnisse sollte auch das anaerob induzierte Protein ANA auf eine potentiell vorhandene Aktivierungsdomäne in Hefe analysiert werden. Für diese Untersuchungen wurden Komponenten aus dem „MATCHMAKER Library Construction & Screening Kit“ (Clontech) verwendet.

Zunächst wurden zwei Fusionskonstrukte aus ANA und der DNA-Bindungsdomäne (DNA-BD) des GAL4 Proteins aus *Saccharomyces cerevisiae* kloniert. Einerseits wurde die gesamte ANA codierende Sequenz, die 903 Basenpaare bzw. 301 Aminosäuren umfasst (ANA₁₋₃₀₁), und andererseits der N-Terminus von ANA mit 498 Basenpaaren bzw. 166 Aminosäuren (ANA₁₋₁₆₆) so in pGBKT7 kloniert, dass translationale Fusionen mit der GAL4 DNA-BD entstanden. Anschließend wurde die Aktivität eines durch sie

kontrollierten Reportergens in einem quantitativen Test bestimmt (Kapitel 2.17.7). Als Kontrollplasmid wurde pCL1 eingesetzt, das den vollständigen transkriptionellen Aktivator GAL4 aus Hefe exprimiert. Im Hefereporterstamm AH109 binden die Fusionsproteine bzw. das Kontrollprotein mit ihrer GAL4 DNA-BD an ein GAL4-responsives Minimalpromotorelement. Verfügt das gebundene Protein über eine Aktivierungsdomäne, so wird die Transkription des downstream gelegenen *lacZ* Reportergens aktiviert. In einem Flüssigkultur- β -Galactosidase Test kann der enzymatische Umsatz von ONPG zu o-Nitrophenol und D-Galactose durch die exprimierte β -Galactosidase quantifiziert werden (Kapitel 2.17.7; Anhang 7.1).

In Abbildung 6 sind die relativen β -Galactosidase Aktivitäten in einem Säulendiagramm wiedergegeben. Dabei wurde der Mittelwert der gemessenen β -Galactosidase Einheiten von pCL1 auf 100% gesetzt und die Aktivität der beiden getesteten Konstrukte relativ zur Positivkontrolle dargestellt. Aus dem Diagramm geht hervor, dass die β -Galactosidase-Aktivität des Hefestammes, der das Fusionsprotein aus dem 301 Aminosäuren langen ANA und der GAL4 DNA-BD exprimiert (ANA₁₋₃₀₁), ca. 23% der Aktivität des Kontrollstammes zeigt, während die β -Galactosidase-Aktivität des Stammes mit dem ANA₁₋₁₆₆-Fusionskonstrukt lediglich 0,5% beträgt. Das ANA₁₋₃₀₁-GAL4 DNA-BD Fusionsprotein verursacht offensichtlich eine erhöhte β -Galactosidase-Aktivität im Vergleich zum ANA₁₋₁₆₆-Fusionsprotein, was auf eine Transkriptionsaktivierung des Reportergens durch das ANA₁₋₃₀₁-Konstrukt zurückgeführt werden kann. Daraus resultiert, dass in Folge einer C-terminalen Deletion des ANA um 135 Aminosäuren die transaktivierende Wirkung des ANA nahezu vollständig aufgehoben wird.

In Hefe konnte also die Annahme einer funktionellen C-terminalen Aktivierungsdomäne innerhalb des ANA bestätigt werden.

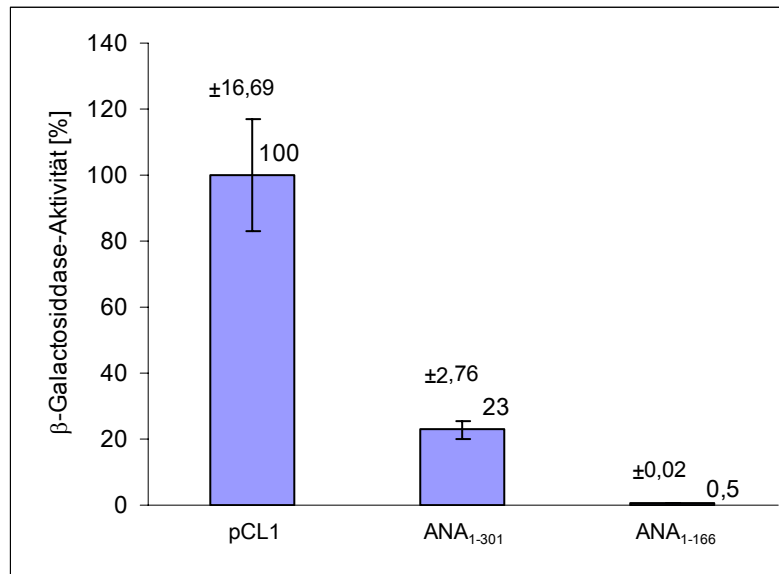


Abb. 6: Quantitative Bestimmung der β -Galactosidase-Aktivitäten zweier ANA-GAL4BD-Fusionsproteine, inklusive potentieller ANA-Aktivierungsdomäne (ANA₁₋₃₀₁), bzw. ohne potentielle Aktivierungsdomäne (ANA₁₋₁₆₆) relativ zur GAL4 exprimierenden Positivkontrolle (pCL1) im Yeast Two Hybrid System. Die tiefergestellten Zahlen geben die klonierte ANA-Sequenz in Aminosäuren wieder. Es sind die Mittelwerte der prozentualen β -Galactosidase-Aktivitäten einschließlich ihrer Standardabweichungen angegeben.

3.2.4 ANA bindet sequenzspezifisch an den CaMV 35S Promotor

Da Transkriptionsfaktoren sequenzspezifisch an *cis*-Elemente innerhalb von Promotoren binden, wurde die DNA-Bindungsaffinität und -spezifität des Transkriptionsfaktors ANA anhand eines 118 Basenpaar langen DNA-Fragmentes untersucht. Die zentralen 100 Basenpaare dieses Fragmentes entsprechen der Sequenz des CaMV 35S Promotors von Basenpaar -159 bis -57. Das CaMV 35S Promotorfragment wurde als potentielle Zielsequenz für ANA ausgewählt, da bereits durch DNA Footprint-Experimente eine Bindungsaktivität an das -162 bis -60 bp Fragment des CaMV 35S Promotors durch AtNAM gezeigt wurde (Duval *et al.*, 2002). Bei AtNAM handelt es sich um ein Protein der NAC Familie aus *Arabidopsis thaliana*, das aus sich entwickelnden Samen isoliert wurde. Die DNA-Bindungsaktivität von ANA wurde *in vitro* durch Gelshift-Experimente analysiert. Dazu wurde rekombinantes und aufgereinigtes 6xHis-tagged ANA Protein eingesetzt (Kapitel 2.13). ANA wurde zusammen mit radioaktiv markiertem CaMV 35S Promotorfragment zur Bindung des Proteins an die Promotorsequenz inkubiert (Kapitel 2.14). Die Spezifität eines potentiellen Protein-DNA-Komplexes wurde durch Einsatz eines spezifischen bzw. unspezifischen Kompetitors überprüft. Als spezifischer Kompetitor wurde das 118 bp lange Fragment des 35S Promotors unmarkiert in 1000-

fach molarem Überschuß eingesetzt. Das 93 bp lange zufällig ausgewählte DNA Fragment uK93 (Kapitel 2.14.1.1) diene in ca. 1000-fach molarem Überschuß als unspezifischer Kompetitor. Anschließend wurden die Bindungsreaktionen in einem 5%igen nicht-denaturierenden Polyacrylamidgel aufgetrennt (Kapitel 2.14.3).

Abbildung 7 zeigt das Autoradiogramm der im Polyacrylamidgel aufgetrennten Protein-DNA-Bindungsreaktionen. Beim Kontrollansatz ohne Protein ist lediglich das Signal der freien Sonde (S) zu sehen (Spur 1). Wird das radioaktiv markierte 35S Promotorfragment zusammen mit ANA in der Bindereaktion eingesetzt, so tritt zusätzlich zur freien Sonde (S) ein retardierter Komplex (K) auf (Spur 2). Dieser ist offensichtlich auf eine Interaktion zwischen Protein und radioaktiv markiertem Promotorfragment zurückzuführen. Wird dem Protein spezifischer Kompetitor in 1000-fach molarem Überschuß im Vergleich zur Sonde zugefügt, so bindet ANA präferentiell an das nicht radioaktiv markierte 35S Promotorfragment. Daraus resultiert eine deutlich reduzierte Signalstärke des ANA-35S-Komplexes (Spur 3). Bei Zugabe von 1000-fach molarem Überschuß an unspezifischem Kompetitor zum Reaktionsansatz aus Protein und Sonde wird ein retardierter Komplex detektiert, der in Wanderungsgeschwindigkeit und Intensität mit dem auf Spur 2 vergleichbar ist (Spur 4). Folglich bindet ANA nicht oder mit einer deutlich geringeren Affinität an das DNA Fragment uK93 als an das 118 bp Fragment des 35S Promotors. Zusammenfassend ist festzustellen, dass das rekombinante ANA im Gelshift-Experiment spezifisch an das untersuchte Fragment des CaMV 35S Promotors bindet.

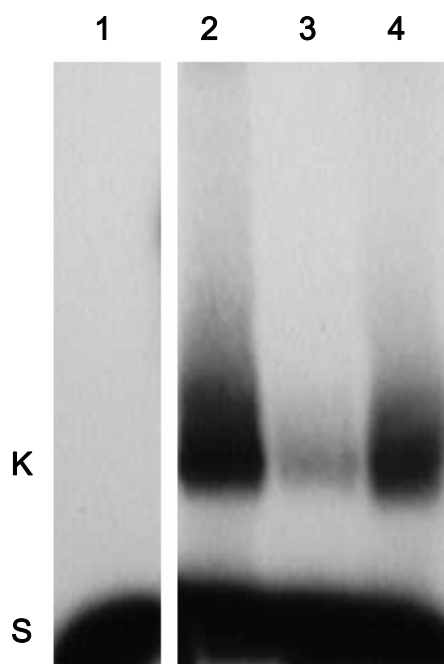


Abb. 7: Gelshift-Experiment zur Untersuchung der Bindungsspezifität von ANA an den CaMV 35S Promotor. Spur 1: 0,3 ng radioaktiv markiertes 118 bp CaMV 35S Promotorfragment ohne Protein. Spur 2-4: wie Spur 1, zusätzlich mit 500 ng rekombinatem 6xHis-ANA. Spur 1 und 2: ohne Kompetitor. Spur 3: 300 ng spezifischer Kompetitor (CaMV 35S). Spur 4: 300 ng unspezifischer Kompetitor (uK93). S: freie Sonde; K: retardierter Protein-DNA-Komplex

3.2.5 Im transienten System bewirkt ANA keine Aktivierung des CaMV 35S Promotors

ANA wirkt in Hefe transkriptionsaktivierend (Kapitel 3.2.3). Dieses Ergebnis sowie die Lokalisierung der Aktivierungsdomäne im C-terminalen Bereich des NAC Proteins (Kapitel 3.2.3) entsprechen den Erwartungen aufgrund von Literaturdaten (Duval *et al.* 2002). Um die Funktion von ANA im pflanzlichen System zu analysieren, wurde ein Cotransformations-Experiment in Tabak durchgeführt. Da die Bindung von ANA an den CaMV 35S Promotor gezeigt wurde (Kapitel 3.2.4), sollte die Aktivität eines β -Glucuronidase-Reportergens, das durch den CaMV 35S Promotor kontrolliert wird, bei Coexpression von ANA untersucht werden.

Die funktionelle Analyse von ANA erfolgte durch Cotransformation folgender Konstrukte mittels Partikelkanone (Kapitel 2.15.2): Das Effektorplasmid exprimiert den funktionell zu untersuchenden ANA Transkriptionsfaktor unter der Kontrolle des CaMV 35S Promotors (35S-ANA) bzw. enthält keine ANA codierende Sequenz als Kontrolle (-). Das Reporterplasmid stellt das Promotor-Reportergenkonstrukt 35S-GUS bereit, und als Transformationskontrolle wird ein durch den C1 Promotor reguliertes Luciferasegen eingesetzt (C1-LUC).

Das Säulendiagramm in Abbildung 8 stellt die Reportergenaktivität der beiden vergleichenden Versuchsansätze, die sich lediglich im transformierten Effektorplasmid unterscheiden, dar. Die Mittelwerte und Standardabweichungen der GUS-Aktivität ohne bzw. mit coexprimiertem Effektor wurden aus 3 bzw. 4 Meßwerten von insgesamt je 4 Transformationsereignissen errechnet (Anhang 7.2). Die transiente Transformation von 35S-GUS ohne Effektor ergab eine GUS-Aktivität von $737 \text{ pmol } 4\text{-MU} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ Protein}$, wobei die Standardabweichung $\pm 213 \text{ pmol } 4\text{-MU} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ Protein}$ betrug. Durch Coexpression von ANA als Effektor wurde eine um ca. 50% reduzierte GUS-Aktivität gemessen. Offensichtlich führt ANA im transienten System zu einer Reduktion der Reportergen-Aktivität im Vergleich zur GUS-Aktivität, die nicht durch einen coexprimierten Effektor beeinflusst wird. Dieses Ergebnis widerspricht scheinbar den Erwartungen. Trotz einer potentiellen Aktivierungsdomäne, die in Hefe nachgewiesen wurde (Kapitel 3.2.3), zeigt ANA nach transienter Transformation in Tabakblätter keine transkriptionsaktivierende Funktion. Diese Beobachtung könnte auf eine Kompetiton von ANA mit anderen Transkriptionsfaktoren um Bindungsstellen des Promotors zurückzuführen sein. Möglicherweise zeigt ANA zwar einen transkriptionsaktivierenden Effekt, der jedoch nicht so stark ist, wie die Wirkung anderer bekannter Transkriptionsaktivatoren.

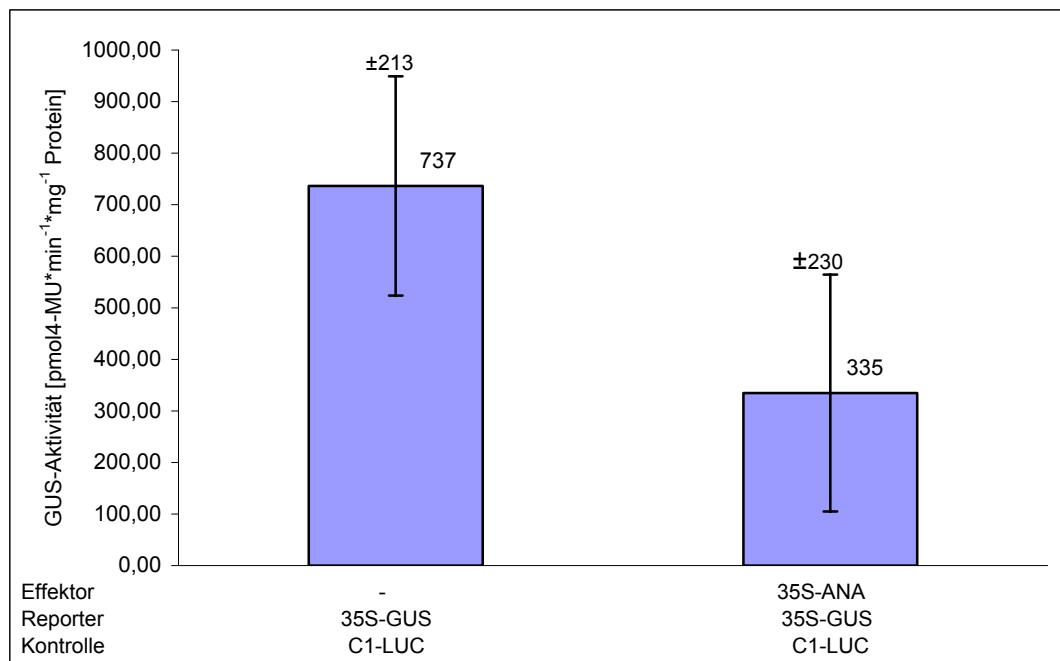


Abb. 8: Cotransformationsexperiment zur Untersuchung des Effekts von ANA auf den CaMV 35S Promotor. Tabakblattmaterial wurde transient durch die Partikelkanone mit einem Effektor-, einem Reporter- und einem Kontrollplasmid cotransformiert. Nach aerober Inkubation wurde die Reporterogen-Aktivität in einem quantitativen β -Glucuronidase Test bestimmt und relativ zur Expression des Kontrollplasmids quantifiziert. Die Mittelwerte und Standardabweichungen der gemessenen GUS-Aktivitäten sind in [pmol 4-MU*min⁻¹*mg⁻¹ Protein] aufgetragen. -: Plasmid ohne Effektor, aber mit entsprechendem Promotor.

3.3 Strukturelle und funktionelle Analyse von ABZ1

3.3.1 ABZ1 ist ein bZIP Transkriptionsfaktor

Für das SSH Fragment 74, das Homologien zur mRNA von bZIP Transkriptionsfaktoren aufweist (Kapitel 3.1), wurde ein vollständiger cDNA Klon aus einer anaeroben cDNA Bank aus Tomatenpflanzen isoliert (Kapitel 2.12).

Ca. 200000 Kolonien einer anaeroben cDNA-Bank (5×10^5 cfu/ml) wurden gescreent, von denen 32 ein positives Hybridisierungssignal in der ersten Screeningrunde zeigten. 10 der potentiell positiven Klone wurden in einem zweiten Screen vereinzelt und verifiziert. Durch Testspaltung mit *NotI/EcoRI* wurde ein Klon mit möglichst großem cDNA-Insert identifiziert und sequenziert.

Der Homologievergleich sowohl der cDNA Sequenz als auch der daraus resultierenden Aminosäuresequenz bestätigte die Annahme, dass es sich bei ABZ1 um einen bZIP Transkriptionsfaktor handelt. Die höchste Sequenzidentität von 86% trat im BLAST Search auf Aminosäureebene mit dem bZIP Transkriptionsfaktor BZI-4 aus *Nicotiana tabacum* auf (Strahtmann *et al.*, 2001).

In Abbildung 9 ist die Nucleotid- sowie die resultierende Aminosäuresequenz des vollständigen cDNA Klons aufgeführt. Die cDNA besteht aus 1216 Basenpaaren, die mit 20 Adenosinresten den PolyA-Schwanz einschließt. 414 Basenpaare (597-1010) stellen die codierende Region dar, die in 138 Aminosäuren translatiert wird (ABZ1). Das berechnete Molekulargewicht des ABZ1 Proteins beträgt 15,4 kDa und hat einen pKi-Wert von 9,84. 596 Basenpaare bilden die auffallend lange 5'UTR, während der 3'-nicht translatierte Bereich 186 Basenpaare umfasst. Innerhalb der 5' Leaderregion tritt ein konservierter upstream gelegenes offenes Leseraster (uORF) auf, der die Basenpaare 358 bis 447 umfasst. Dieser enthält ein den uORFs anderer pflanzlicher bZIP Faktoren ähnliches Aminosäuresequenzmotiv, das vermutlich eine post-transkriptionelle Kontrolle impliziert (Martinez-Garcia *et al.*, 1998; Jakoby *et al.*, 2002). Innerhalb des uORF von ABZ1 treten hoch konservierte Aminosäuren dieses Sequenzmotivs auf (Fettdruck). Das 352 bp lange SSH Fragment ist über 320 bp identisch mit dem 5'-Bereich der ABZ1 codierenden Sequenz, und 32 bp entsprechen der 5' gelegenen Sequenz der nicht translatierten Region (Unterstreichung). Der N-terminale Bereich, der keine Struktur-Homologien aufweist, besteht aus 24 Aminosäuren, während der C-Terminus ohne strukturelle Homologien 38 Aminosäuren lang ist. An relativ zentraler Position innerhalb des Proteins ist die sog. bZIP Domäne von ABZ1 lokalisiert, die 76 Aminosäuren umfasst. Die bZIP Domäne wird in eine basische sowie eine Leucinzipper Domäne unterteilt. Die basische Domäne beinhaltet die Aminosäuren 25 bis 46 (Unterlegung), ist durch einen hohen Anteil an basischen Aminosäuren charakterisiert und dient als DNA

Bindungsdomäne (Arginin R und Lysin K). Innerhalb der basischen Domäne konnte durch *in silico* Analyse mit Hilfe sowohl des Psort als auch des ScanProsite Programmes der SwissProt Datenbank eine zweigeteilte Kernlokalisierungsstelle (NLS) nach einem Kriterium von Robbins *et al.* (1991) identifiziert werden (Kapitel 2.18; Abb. 9, Kursivdruck). Diese enthält zwei basische Aminosäuren, denen sich ein 10 Aminosäuren langer Spacer und mindestens 3 basische Aminosäuren innerhalb der folgenden 5 Positionen anschließt. Der Leucin-Zipper, der die Aminosäuren 47 bis 100 umfasst, fungiert als Protein-Protein-Interaktionsdomäne. Er zeichnet sich durch fünf Leucine und ein Isoleucin aus (rot, Fettdruck), die in einem Abstand von exakt 7 Aminosäuren auftreten, wobei das Leucin-Zipper-Motiv durch zwei Aminosäuren (Threonin T und Cystein C) unterbrochen ist. Die Primärstruktur liefert keinen Hinweis auf eine transkriptionsaktivierende Domäne des ABZ1.

```

1      CGTAATCTTCTTCTTCTTCTCCGCCTCCAAATAAATAAAATATAAACTTTCTG
57  GTTTCCCCATATTAATCTCTTCTTAATCGTCTCTACCTACCATTTTGTCTTTTCACCT
117 TCTTCTTGATTCTTTTTTCCCCCTTCTTTCATCAATCCACCTTTGTTCATTGTCACAAA
177 AAAGATTGCCTTTTTTGGCACAACCCCATATCTCAATTTTTCACATTTTCTGAAGTTG
237 TTGTTTGTACTATTTATTTTGAGAAATTTCAAGGTGGGTAATTTACTTTCTGGGGTTGT
297 TGCTGATTTTGATTTTTCATGACAATGAATTTGGGGTTTCTTTAGTTAGGAATCAATC
357 TATGATCTCTGCCATTTCCATCACTTTTTTAGGCGATTGTTTTCGTCATCTTTCTCTGT
      M I S A I S I T F L G D C F R Q S F S V
417 GCTGTTTCTCTACCATTTTATGATTTTTCATGAATAGAAATAAATATCCACTGAAAAAG
      L F L Y H F Y D F S *
477 TATTTTTTTTCTAAAAAAGAAAAAATTGTTGAAGAATAGACTTTTTTATTTTATTTGTG
537 TTGGCACTCTTGAAATCATAGATTGGGGTACTGTTGATTTATATTGGAGAGAAAAAAA
597 ATGTCACCTTTAAGGCAGAGTGCTAGTTCATCTGCATCAGATGATGATCAAAGGTATGCA
      1 M S P L R Q S A S S S A S D D D Q R Y A
657 GGAATGGATGAGAAGAAGAGGAAAAGGATGATTTCCAACAGGGAATCTGCGAGGCGATCG
      21 G M D E K K R K R M I S N R E S A R R S
717 AGGATGAAGAAGCAGAAGCTTCTGCAAGATTTGACAGGGGAAGTGAGCAGATTACAGGGT
      41 R M K K Q K L L Q D L T G E V S R L Q G
777 GCAAATAAGAATATTGTGTCTAAGATTGATGAGACAACAGAAAGATATGCAATTTGTGCG
      61 A N K N I V S K I D E T T E R Y A I C A
837 GCACAGAACAAATGTGTTGAGGGCACAAGCAATGGAATTGACTGATAGGCTCAGGTATTTA
      81 A Q N N V L R A Q A M E L T D R L R Y L
897 AATGATGTTATTGACAGTACTGGTTGGCTGCTGATGTTGCTGATCCTTTGTTGAAGCCA
101 N D V I D S T G L A A D V A D P L L K P
957 TTGCAGAATCCTTGTCATGCAGCCTATTGCTTCATCAGGATTGTTAAATTTAATCG
121 L Q N P C A M Q P I A S S G L F K F *
1017 TTGTAATGGCTTGTGTTGGATAGCGTTGCTTCCATTAGTCTATATTCTAGTAGTTTCCTTG
1077 GATGGTAATGTCATGTTAGTTATGCCTTTGTTGGTTATGTTTTAGTGTCTGCTTACTCTT
1137 TTTTAACCATGTAAATACCAAGAATTAGCTTGGAGTTGTTGAATCGGATGTTTGTATCTT
1197 AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

```

Abb. 9: Nucleotid- und daraus abgeleitete Aminosäuresequenz von ABZ1 einschließlich des konservierten Sequenzmotivs im 5' uORF (Fettdruck), des SSH Fragmentes (Unterstreichung), der basischen Domäne (Unterlegung) mit zweigeteilter NLS (Kursivdruck) und des heptameren Leucin-Zippers (rot, Fettdruck)

3.3.2 ABZ1 gehört einer Familie kleiner bZIP Transkriptionsfaktoren an

Anhand einer phylogenetischen Analyse sollte dargestellt werden, wie nah die ABZ1 Aminosäuresequenz mit Sequenzen bekannter bZIP Transkriptionsfaktoren, deren Funktion bereits untersucht wurde, verwandt ist. Ausgehend von einem multiplen Alignment (ClustalX, Kapitel 2.18) der basischen und der Leucin-Zipper Domänen 16 unterschiedlicher bZIP Faktoren wurde ein phylogenetischer Stammbaum nach der Neighbor Joining Methode erstellt.

Der phylogenetische Baum ist in Abbildung 10 dargestellt. Den Bezeichnungen der einzelnen Transkriptionsfaktoren sind die Abkürzungen der jeweiligen Speziesbezeichnungen nachgestellt. Zm steht für *Zea mays*, Os für *Oryza sativa*, Nt für *Nicotiana tabacum*, Le für *Lycopersicon esculentum*, Am für *Antirrhinum majus* und Pc für *Petroselinum crispus*. Die horizontalen Astlängen sind proportional zur Austauschfrequenz der Aminosäuren, wobei der angegebene Maßstab von 0,1 zehn Austauschen pro hundert Aminosäuren entspricht und ein Maß für die verwandtschaftliche Nähe zwischen den Proteinen einer Verzweigung ist. Die phylogenetische Analyse zeigt, dass ABZ1 am nächsten mit BZI-4 aus Tabak (Strathmann *et al.*, 2001; AAK92215) verwandt ist. ABZ1 und BZI-4 können zusammen mit bZIP911 und bZIP910 aus dem Löwenmäulchen (Martinez-Garcia *et al.*, 1998; CAA74023 und CAA74022), CPRF6 aus Petersilie (Rügner *et al.* 2001; CAC00657), BZI-3, tbz17 und BZI-2 aus Tabak (AAK92214, Strathmann *et al.*, 2001; T02016, Kusano *et al.*, 1998; AAK92213, Strathmann *et al.*, 2001) sowie mLIP15 aus Mais (Kusano *et al.*, 1995; BAA05617) und LIP19 aus Reis (Aguan *et al.*, 1993; CAA40596) in eine Subfamilie kleiner bZIP Transkriptionsfaktoren eingeteilt werden. Sie sind alle relativ nah miteinander verwandt und bestehen aus 133–170 Aminosäuren, während die verwandtschaftlich weiter entfernten bZIP Transkriptionsfaktoren BZI-1 aus Tabak (Heinekamp *et al.*, 2002; AAL27150), GBF1 aus Mais (de Vetten und Ferl, 1995; AAA80169), GBF12, GBF4 und GBF9 aus Tomate (Meier und Grissem, 1994; CAA52895, CAA52896 und CAA52897) sowie CPRF1 aus Petersilie (Feldbrügge *et al.*, 1996; Q99089) 232–450 Aminosäuren umfassen.

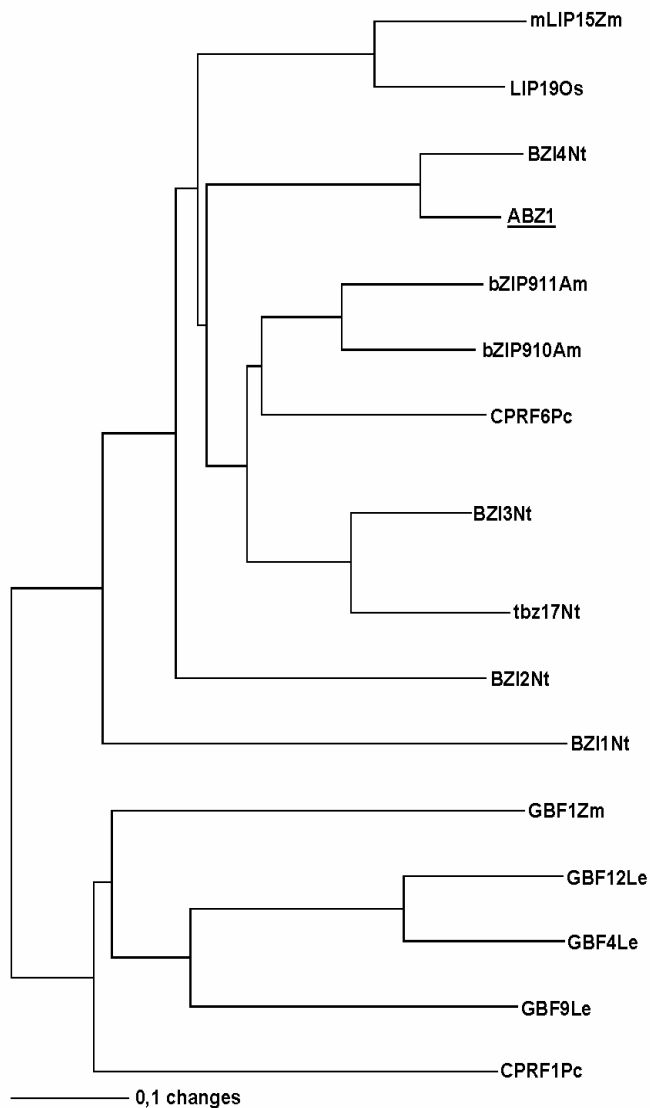


Abb. 10: Phylogenetischer Stammbaum, der anhand der bZIP Domänen von ABZ1 und anderen pflanzlichen bZIP Transkriptionsfaktoren unter Einsatz der Neighbor Joining Methode erstellt wurde.

Aufgrund des Primärstrukturvergleichs der bZIP Domäne wird festgestellt, dass ABZ1 einer Subfamilie kleiner bZIP Transkriptionsfaktoren angehört. Eine funktionelle Gemeinsamkeit dieser kleinen Transkriptionsfaktoren besteht darin, dass sie oft durch Stress transkriptionell induziert werden (Jakoby *et al.*, 2002).

3.3.3 Die basische Domäne vermittelt die Kernlokalisierung von ABZ1

ABZ1 sollte als bZIP Transkriptionsfaktor funktionell im Zellkern aktiv sein. Diese Annahme wurde bereits durch eine *in silico* Analyse der Aminosäuresequenz auf ein Signalpeptid zur Kernlokalisierung unterstützt (Kapitel 3.3.1) und sollte experimentell verifiziert werden.

Da das Kernlokalisierungssignal gemäß der *in silico* Analyse in einem Bereich der Aminosäure 25 bis 44 lag, wurden translationale Fusionskonstrukte zwischen ABZ1 Peptidsequenzen und dem GUS Reporterprotein hergestellt (Kapitel 2.15.1.1). Einerseits wurde die gesamte codierende Sequenz von ABZ1, die 138 Aminosäuren einschließt, in pRT103 kloniert (ABZ1₁₋₁₃₈-GUS). Andererseits wurden C- oder N-terminale Deletionskonstrukte des ABZ1 kloniert. Die verkürzten Konstrukte ABZ1₁₋₂₄-GUS und ABZ1₄₅₋₁₃₈-GUS enthalten das vorausgesagte Signalpeptid nicht, während das Konstrukt ABZ1₁₋₄₄-GUS die 44 N-terminalen Aminosäuren, inklusive des Kernlokalisierungssignals, beinhaltet. Die tiefergestellten Zahlen der Konstruktbezeichnungen geben die klonierte Sequenz in Aminosäuren wieder. Durch die Partikelkanone wurden diese zu untersuchenden und auf Goldpartikeln fixierten Konstrukte transient in Zwiebelepidermiszellen transformiert (Kapitel 2.15.1.2). Als Negativkontrolle der Kernlokalisierung wurde pRT103-GUS transformiert. Nach GUS- und DAPI-Färbung wurden die Epidermiszellen mikroskopiert und fotografiert.

Abbildung 11 gibt die Ergebnisse des transienten Experimentes wieder. Die Negativkontrolle (GUS) zeigt, dass ohne ein Kernlokalisierungssignal das GUS-Protein gleichmäßig im gesamten Cytoplasma verteilt vorliegt. Vergleichbare Ergebnisse liefert die Transformation von Zwiebelepidermiszellen mit dem Konstrukt ABZ1₁₋₂₄-GUS, das lediglich die 24 N-terminalen Aminosäuren ohne Signalpeptid exprimiert. Das Fusionsprotein, das jedoch die 44 N-terminalen Aminosäuren von ABZ1 einschließlich des vorausgesagten Kernlokalisierungssignals enthält, wird teilweise in den Zellkern transportiert, was neben einer cytoplasmatischen GUS-Färbung durch eine Konzentration der GUS-Färbung im Zellkern sichtbar wird. Werden Zwiebelepidermiszellen mit dem Konstrukt ABZ1₁₋₁₃₈-GUS transformiert, wird die GUS-Färbung ausschließlich im Zellkern detektiert. Dass die Fusionsproteine ABZ1₁₋₄₄-GUS und ABZ1₁₋₁₃₈-GUS im Zellkern vorliegen, wird durch die Aufnahme derselben Zellen nach Anregung des Fluoreszenzfarbstoffes DAPI bei 360-370 nm, wodurch die Zellkerne hell erscheinen, deutlich. Aus den bisherigen Ergebnissen resultiert, dass das Signalpeptid, das für die Kernlokalisierung des ABZ1 maßgeblich verantwortlich ist, zwischen Aminosäure 25 und 44 liegt. Allerdings wird eine vollständige Kernlokalisation erst durch das Konstrukt ABZ1₁₋₁₃₈-GUS erzielt. Daher wurde das Konstrukt ABZ1₄₅₋₁₃₈-

GUS, das den ABZ1 C-Terminus mit den Aminosäuren 45 bis 138 enthält, auf eine evtl. weitere essentielle Peptidsequenz zur Kernlokalisierung analysiert. Nach Transformation dieses Konstruktes konnte jedoch lediglich eine gleichmäßige Verteilung des ABZ1₄₅₋₁₃₈-GUS-Fusionsproteins im Cytoplasma detektiert werden. Somit deutet diese Beobachtung auf kein weiteres eigenständiges Signalpeptid im C-Terminus hin.

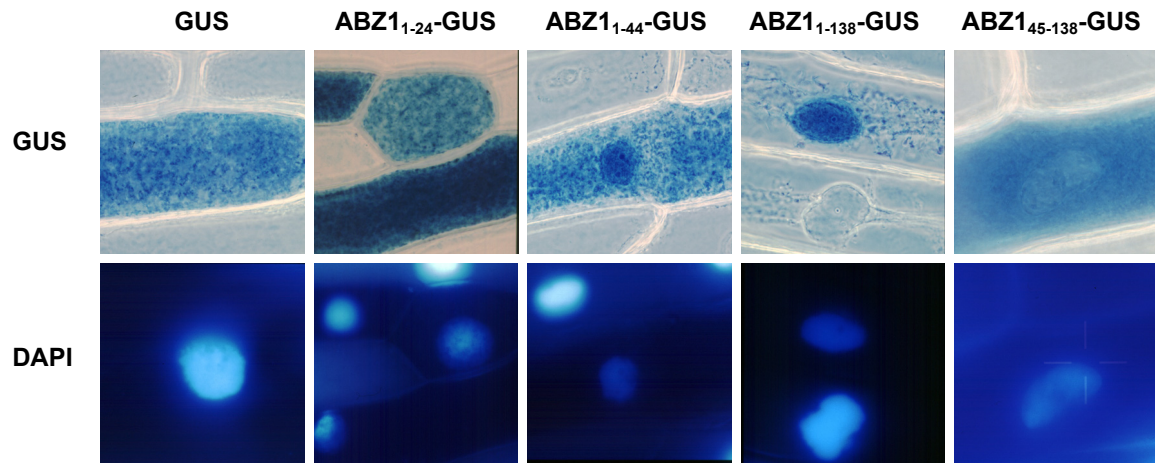


Abb. 11: Untersuchungen zur Kernlokalisierung von ABZ1. GUS- und DAPI-Anfärbung von Zwiebelepidermiszellen nach transienter Expression unterschiedlicher ABZ1-GUS-Fusionsproteine. Die tiefergestellten Zahlen innerhalb der Konstruktbezeichnungen geben die klonierten Bereiche des ABZ1 in Aminosäuren wieder. Die Negativkontrolle exprimiert β -Glucuronidase alleine (GUS). Die Transformation erfolgte durch Goldpartikelbeschuss mit der Partikelkanone.

3.3.4 ABZ1 bindet sequenzspezifisch an die G-Box Core Sequenz

Aus der Analyse der ABZ1 codierenden DNA- und Aminosäuresequenz ging hervor, dass ABZ1 innerhalb seiner hoch konservierten bZIP Domäne eine basische Region besitzt (Kapitel 3.3.1). Solche basischen Domänen dienen der Bindung von Transkriptionsfaktoren an spezifische DNA Sequenzen. Um eine Sequenz-spezifische DNA Bindung von ABZ1 nachzuweisen, wurde ein sog. Random Binding Site Selection (RBSS) Assay durchgeführt (Kapitel 2.14.1). Unter Verwendung der RBSS Methode sollten, ausgehend von einer Population zufälliger Oligonucleotide, diejenigen DNA Sequenzen selektiert und identifiziert werden, die potentielle Zielsequenzen für ABZ1 darstellen.

Die eingesetzten Oligonucleotide enthielten eine G-Box Core Sequenz (ACGT) sowie 10 flankierende zufällige Nucleotide. Als Annealingsites für PCR-Primer waren 5' und 3' flankierende Linkersequenzen notwendig. Nach Zweitstrangsynthese der

Oligonucleotide, wodurch gleichzeitig eine radioaktive Markierung der resultierenden Zufallsfragmente erfolgte, wurden die DNA Fragmente in einer Bindungsreaktion mit rekombinantem ABZ1 inkubiert. Die gebildeten Protein-DNA-Komplexe wurden in einem nativen 6,5%igen Polyacrylamidgel isoliert, die gebundenen DNA Fragmente extrahiert und in einer radioaktiven Polymerasekettenreaktion (PCR) amplifiziert. Die PCR-Produkte wurden als Ausgangsmaterial für eine neue Runde bestehend aus selektiver Bindungsreaktion, Aufreinigung und Amplifikation eingesetzt. Nach fünf Selektionsrunden wurden die potentiellen Zielsequenzen für ABZ1 kloniert und sequenziert.

In Tabelle 7A sind die Sequenzen von 18 der selektierten DNA-Bindungsstellen für ABZ1 sowie ihre Labor-internen Bezeichnungen aufgeführt (Spalte 1, RBSS Nr.). Ausgehend vom Zentrum der palindromischen Core Sequenz sind die einzelnen Nucleotidpositionen in 5'- bzw. 3'-Richtung von +0 bis +6 bzw. von -0 bis -6 durchnummeriert (Martinez-Garcia *et al.*, 1998). Alle potentiellen ABZ1 Zielsequenzen, außer Sequenz RBSS 10.1, verfügen über die zentrale G-Box Core Sequenz (Tab. 6A, rot). Die flankierenden Sequenzen spiegeln die Bindungsspezifität des ABZ1 Transkriptionsfaktors wieder. Besonders häufig tritt an der Position +2 oder an den Positionen +2 und +3 Guanin auf, das zusammen mit der Core Sequenz halbe G-Boxen darstellt. Die Sequenzen der Klone RBSS1.1, 6, 5.1 und 5 weisen zusätzlich an der Position -2 oder den Positionen -2 und -3 Cytosin auf, so dass palindromische G-Box Sequenzen vorliegen. Weiterhin ist Thymin häufig an Position -3 sowie Guanin an Position -5 vertreten.

Anhand der Häufigkeit, mit der jedes Nucleotid an jeder einzelnen Position des betrachteten Sequenzabschnittes auftritt, kann eine Matrize erstellt werden. Die für die Zielsequenzen von ABZ1 berechnete Matrize ist in Tabelle 7B dargestellt. Die Matrize bildet die Grundlage zur Erstellung der Consensus Sequenz. Das Vorgehen beim Aufstellen der Consensus Sequenz entsprach folgenden Richtlinien unter Einsatz des IUPAC-Codes (Cavener, 1987; IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature, 1971). Kommt ein Nucleotid an einer Position mit einer Frequenz von mindestens 50% und mindestens doppelt so häufig vor, wie das zweithäufigste Nucleotid, so wird das häufigste Nucleotid an dieser Position für die Consensus Sequenz übernommen (Tab. 7B; G an Positionen +2 und +3 sowie T an Position -3). Ein Doppelt-Mehrdeutigkeitsbuchstabe wird verwendet, wenn zwei Nucleotide an einer Position zusammen mindestens mit einer Häufigkeit von 75% auftreten und die zuvor beschriebene Regel nicht zutrifft (Tab. 7B, K an Positionen -6, -5 und -2). Kommt an einer Position ein bestimmtes Nucleotid nicht vor, und trifft keine der zuvor erläuterten Regeln zu, so wird ein Dreifach-Mehrdeutigkeitsbuchstabe eingesetzt. Alle Positionen, auf die keine der oben stehenden Regeln zutrifft, werden mit einem N für ein beliebiges Nucleotid versehen (Tab. 7B, Positionen -4, +4, +5 und +6).

Tab. 7: Random Binding Site Selection Assay: A) Mit rekombinantem ABZ1 selektierte Bindungsstellen. Fettdruck: Potentielle Zielsequenzen, die in Gelshift-Experimenten überprüft wurden; rc: revers-komplementäre Sequenz B) Matrizе, die aus 18 *in vitro* mit rekombinantem ABZ1 selektierten Bindungsstellen erstellt wurde, einschließlich der resultierenden Consensus Sequenz.

A	RBSS	-6	-5	-4	-3	-2	-1	-0	+0	+1	+2	+3	+4	+5	+6
	1	G	G	T	T	G	A	C	G	T	G	G	G	A	A
	2	T	G	T	T	G	A	C	G	T	G	G	G	A	C
	3.1	T	T	G	T	G	A	C	G	T	G	G	C	T	G
	8	G	C	C	T	T	A	C	G	T	G	G	G	C	T
	2.1rc	G	T	C	T	T	A	C	G	T	G	G	A	C	A
	4rc	A	A	A	T	G	A	C	G	T	G	G	C	A	A
	1.1	G	G	G	C	C	A	C	G	T	G	G	T	G	T
	11	T	G	A	G	G	A	C	G	T	G	G	T	A	T
	6	T	G	T	A	C	A	C	G	T	G	G	T	G	T
	4.1	G	T	C	G	T	A	C	G	T	G	G	C	A	G
	5.1	A	T	G	C	C	A	C	G	T	G	G	A	A	G
	6.1	G	G	A	T	G	A	C	G	T	G	T	A	G	G
	7.1	T	G	G	T	G	A	C	G	T	G	T	G	C	A
	9.1	T	G	C	A	T	A	C	G	T	G	T	G	C	G
	5	T	G	C	A	C	A	C	G	T	G	T	C	G	C
	9	T	T	T	A	T	A	C	G	T	G	T	C	G	C
	8.1	G	G	A	T	G	A	C	G	T	A	G	G	C	G
	10.1	T	T	G	T	G	A	T	G	T	G	G	G	T	A
B		-6	-5	-4	-3	-2	-1	-0	+0	+1	+2	+3	+4	+5	+6
	A	2	1	4	4	-	18	-	-	-	1	-	3	6	5
	C	-	1	5	2	4	-	17	-	-	-	-	5	5	3
	G	7	10	5	2	9	-	-	18	-	17	13	7	5	6
	T	9	6	4	10	5	-	1	-	18	-	5	3	2	4
	Consensus	K	K	N	T	K	A	C	G	T	G	G	N	N	N

Nach Isolierung und Identifizierung potentieller Zielsequenzen für ABZ1 wurden Gelshift-Experimente durchgeführt, um die Bindungsspezifität von ABZ1 an einige dieser selektierten DNA Sequenzen zu verifizieren.

Dazu wurden die potentiellen Zielsequenzen RBSS 1, 1.1, 2.1, 5, 8, 9 und 6.1 sowie 10.1 in Gelshift-Experimenten als Sonden eingesetzt (Tab. 6A, Fettdruck; Kapitel 2.14.2). Als spezifischer Kompetitor (sK1) diente ein Fragment, dessen Sequenz der von RBSS1 entsprach (Kapitel 2.14.2.1). Als unspezifischer Kompetitor (uK1) wurde ein RBSS1 Fragment mit mutierter Core Sequenz eingesetzt (ACGT→ATTA, Kapitel 2.14.2.1). Die Kompetitoren wurden in 100000-fach molarem Überschuß eingesetzt, und die

elektrophoretische Auftrennung der Bindungsreaktionen erfolgte in einem 6,5%igen nicht denaturierenden Polyacrylamidgel (Kapitel 2.14.3).

In Abbildung 12 sind die Autoradiogramme der elektrophoretischen Gelshift-Assays dargestellt. Exemplarisch für alle Negativkontroll-Reaktionen ohne Protein wird beim Ansatz ohne ABZ1 unter Verwendung des Fragmentes RBSS1 als Sonde lediglich die freie Sonde (S) detektiert (Spur 1). Nach Zugabe von ABZ1, aber ohne Einsatz von Kompetitoren tritt ein retardierter Komplex (K) auf, der auf eine Bindung des rekombinanten ABZ1 an die RBSS1 Sonde zurückzuführen ist (Spur 2). Wird der Reaktion spezifischer Kompetitor in 100000-fach molarem Überschuß zugesetzt, so bindet ABZ1 bevorzugt an das nicht radioaktiv markierte RBSS1 Fragment, und es wird kein radioaktiver Protein-DNA-Komplex detektiert (Spur 3). Bei Zugabe von 100000-fach molarem Überschuß unspezifischen statt spezifischen Kompetitors wird wieder das radioaktive Signal des retardierten ABZ1-RBSS1-Komplexes beobachtet (Spur 4). Daraus folgt, dass es zwischen ABZ1 und der halben G-Box Sequenz des RBSS1 Fragmentes zu einer spezifischen Bindung kommt, die nicht mit einer mutierten Core Sequenz der halben G-Box kompetiert werden kann. Unter Verwendung der RBSS Sonden 1.1 (Spur 5-7), 5 (Spur 11-13) und 6.1 (Spur 20-22) wurden mit RBSS1 als Sonde vergleichbare Ergebnisse erzielt. Folglich stellen, neben halben G-Boxen (RBSS1 und RBSS6.1), auch palindromische G-Boxen (RBSS1.1 und RBSS5) spezifische Zielsequenzen für ABZ1 dar. Jede dieser Zielsequenzen trägt Guanin an Position -5 sowie Guanin oder Thymin an Position -6. Zusätzlich enthalten RBSS1 und 6.1 Thymin an Position -3. Für den retardierten Komplex aus ABZ1 und RBSS2.1 Sonde wird ein auffallend starkes Signal detektiert (Spur 8). Die Zugabe von sK1 führt lediglich zu einer vergleichsweise geringen Kompetition des ABZ1-RBSS2.1-Komplexes (Spur 9), während uK1 keinen Einfluß auf die Bindung von ABZ1 an das RBSS2.1 Fragment hat (Spur 10). Daraus resultiert, dass außer einer halben G-Box und einem Thymin an Position -3 auch Sequenzen von ABZ1 gebunden werden, die statt eines Guanins an Position -5 ein Thymin besitzen. Die unvollständige Kompetition dieses Komplexes mit dem RBSS1 Fragment als spezifischem Kompetitor resultiert vermutlich aus einer spezifischeren Bindung von ABZ1 an RBSS2.1, im Vergleich zu seiner Interaktion mit RBSS1. Die Untersuchung der spezifischen Bindung von ABZ1 an die DNA Fragmente RBSS8 und RBSS9 (Spuren 14-19) führte zu relativ schwachen Signalen der retardierten Komplexe (Spuren 14 und 17). Diese Komplexe konnten mit sK1 vollständig kompetiert werden (Spuren 15 und 18). Allerdings trat auch nach Zugabe von unspezifischem Kompetitor in 100000-fach molarem Überschuß ebenfalls eine reduzierte Bindungsaffinität von ABZ1 an RBSS8 und RBSS9 auf (Spuren 16 und 19). Die potentiellen Zielsequenzen RBSS8 und RBSS9 enthalten eine halbe G-Box, wobei RBSS8 zusätzlich sogar ein Thymin an

Position -3 und RBSS9 ein Thymin an Position -5 trägt. Allerdings besitzt RBSS8 kein Guanin oder Thymin an Position -5, und RBSS9 weist kein Thymin an Position -3 auf. Daraus wird geschlossen, dass das Thymin an Position -3 sowie ein Guanin oder Thymin an Position -5 eine wichtige Rolle für die Sequenz-spezifische Bindung von ABZ1 an halbe G-Box Sequenzen spielen. Liegen hingegen palindromische G-Boxen vor, scheint ABZ1 kein Thymin an Position -3 für eine Sequenz-spezifische DNA-Bindung zu benötigen (RBSS1.1 und RBSS5). RBSS10.1 wurde als Kontrollfragment eingesetzt, um zu zeigen, dass ABZ1 nicht mit DNA Fragmenten interagiert, die keine ACGT Core Sequenz enthalten (Spuren 23-25).

Zusammenfassend ist festzustellen, dass das rekombinante ABZ1 im Gelshift-Experiment spezifisch an verschiedene G-Box Sequenzen bindet. Dabei variiert die Bindungsaffinität und -spezifität mit den die Core Sequenz flankierenden Nucleotiden. Neben der ACGT Core Sequenz scheinen auch ein Guanin oder Thymin an Position -5 sowie ein Thymin an Position -3 für eine Interaktion wichtig, aber nicht essentiell zu sein.

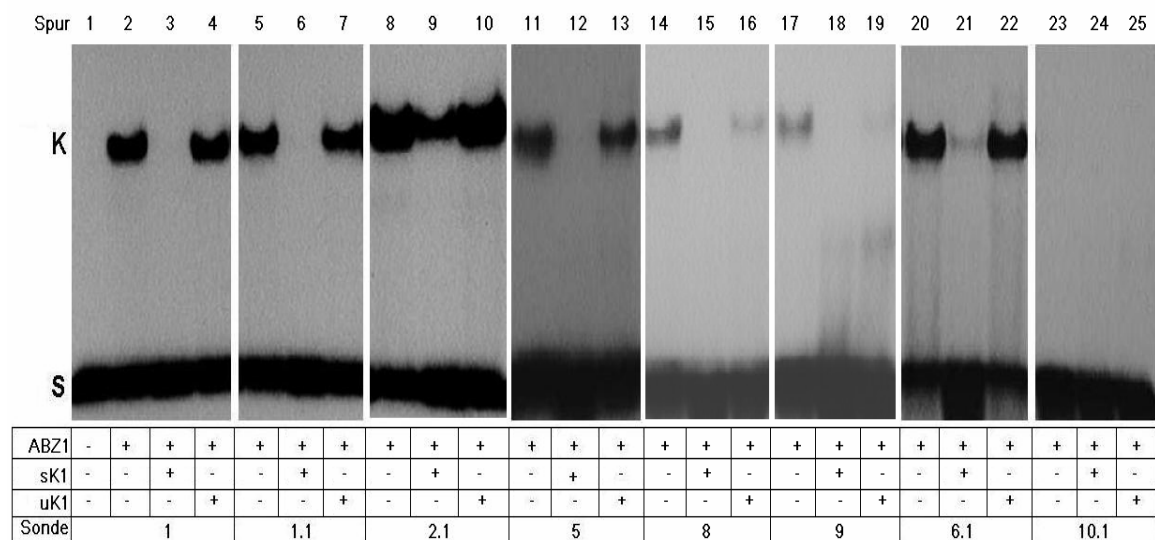


Abb. 12: Elektrophoretische Gelshift-Experimente zur Verifizierung der Bindungsspezifität von ABZ1 an einige der selektierten RBSS Fragmente. Für die Bindungsreaktion wurden 0,1 ng des entsprechenden radioaktiv markierten Fragmentes, 1 µg rekombinantes ABZ1 und 10 µg sK1 (spezifischer Kompetitor RBSS1) oder uK1 (unspezifischer Kompetitor RBSS1 mit mutierter Core-Sequenz) eingesetzt (+) bzw. nicht zugesetzt (-). K: retardierter Protein-DNA-Komplex; S: freie Sonde

3.3.5 ABZ1 bindet spezifisch an den CaMV 35S Promotor

Der CaMV 35S Promotor stellt eine bekannte Zielsequenz für bZIP Transkriptionsfaktoren dar (Lam *et al.*, 1995). Daher wurde untersucht, ob ABZ1 ebenfalls an den CaMV 35S Promotor bindet.

Ein 118 bp großes Fragment, das einen 100 bp langen Sequenzbereich des CaMV 35S Promotors mit drei potentiellen bZIP Faktorbindungsstellen enthält, wurde als Sonde im Gelshift-Experiment verwendet (Kapitel 2.14.2). Die Auftrennung der Bindungsreaktionen mit rekombinantem ABZ1, 35S Promotorfragment sowie ggf. spezifischem bzw. unspezifischem Kompetitor erfolgte im 5%igen nativen Polyacrylamidgel (Kapitel 2.14.3). Als spezifischer Kompetitor (sK1) wurde eine selektierte ABZ1 Zielsequenz aus dem Random Binding Site Selection Assay verwendet (RBSS1; Kapitel 2.14.2.1). Der unspezifische Kompetitor uK1 ist innerhalb der Core Sequenz von RBSS1 mutiert.

In Abbildung 13A ist die Sequenz des 100 bp langen CaMV 35S Promotorfragmentes aufgeführt. Die drei putativen Bindestellen zeichnen sich durch palindromische Core Sequenzen aus (Unterstreichung). Eine der drei putativen Zielsequenzen ist die sog. Activation Sequence-1 (as-1, doppelte Unterstreichung), die von diversen bZIP Transkriptionsfaktoren aus Tabak erkannt wird (Krawczyk *et al.*, 2002). Diese setzt sich aus einem vollständigen und einem unvollständigen Palindrom zusammen, deren Zentren 12 Basenpaare von einander entfernt liegen.

Abbildung 13B zeigt, dass die Gelshift-Analyse zu zwei retardierten Protein-DNA-Komplexen führt (Spur 2), von denen der größere Komplex (K1) vollständig durch 4000-fach molaren Überschuss an sK1 kompetiert werden kann (Spur 3). Der schneller wandernde Komplex (K2) wurde dagegen nicht vollständig durch RBSS1 kompetiert (Spur 3). Durch Zusatz des uK1 Fragmentes in 4000-fach molarem Überschuss wurde die ABZ1 Bindung an den 35S Promotor nicht beeinflusst, und es wurden wieder zwei Protein-DNA Komplexe ausgebildet (Spur 4). Offensichtlich kommt K1 dadurch zustande, dass ABZ1 zusätzlich zur Zielsequenzbindung, die zu K2 führt, weitere Zielsequenzen des 35S Promotorfragmentes mit geringerer Affinität bindet.

Zusammenfassend wird festgestellt, dass der rekombinante ABZ1 Transkriptionsfaktor sequenzspezifisch an den CaMV 35S Promotor bindet.

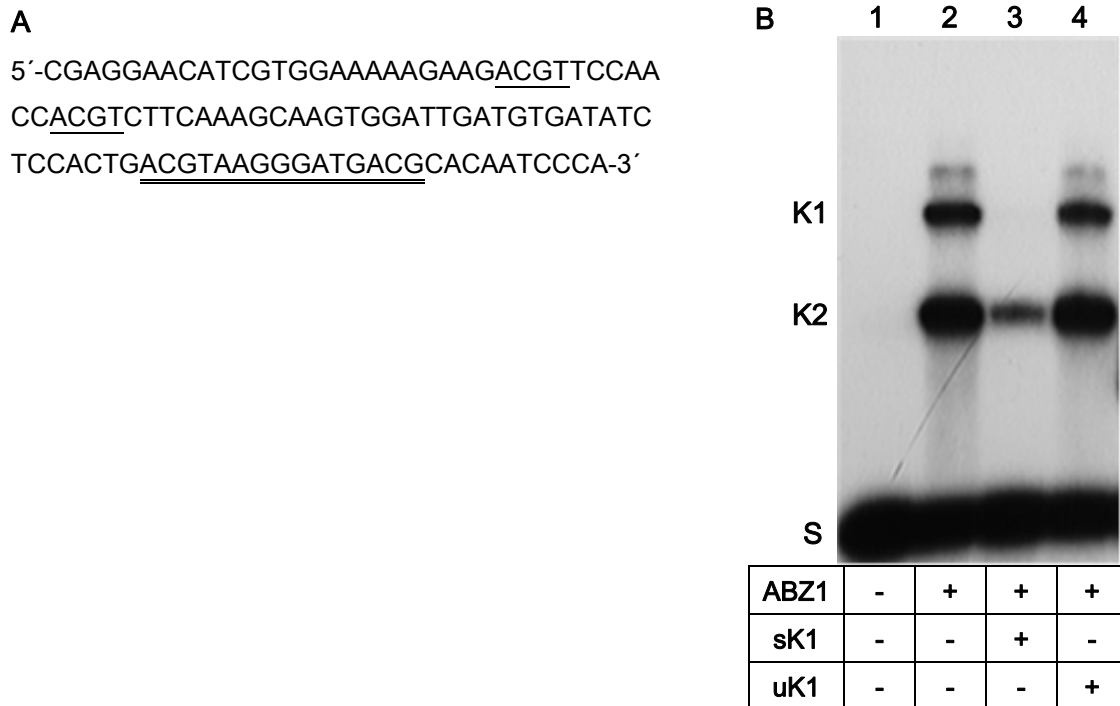


Abb. 13: A) 100 bp Fragment des CaMV 35S Promotors, das als Sonde für das Gelshift-Experiment zur Analyse der Bindungsspezifität von ABZ1 eingesetzt wurde. Die ACGT Core Sequenzen als putative Bindungsstellen sind unterstrichen, wobei die Activation Sequence-1 doppelt unterstrichen ist. B) Gelshift-Experiment zum Nachweis der spezifischen ABZ1 Bindung an den CaMV 35S Promotor. Für die Bindungsreaktion wurden 0,3 ng des radioaktiv markierten 118 bp Promotorfragmentes, 0,5 µg 6x-His-ABZ1 und 4000-fach molarer Überschuß an sK1 (spezifischer Kompetitor RBSS1) oder uK1 (unspezifischer Kompetitor RBSS1 mit mutierter Core Sequenz) eingesetzt (+) bzw. nicht zugefügt (-). K1 und K2: großer und kleiner Protein-DNA Komplex. S: Freie Sonde.

3.3.6 Die DNA-Bindungsdomäne von ABZ1 ist im N-Terminus lokalisiert

Nachdem die spezifische DNA-Bindungsaktivität von ABZ1 gezeigt worden war, sollte die dafür verantwortliche Domäne des bZIP Transkriptionsfaktors lokalisiert werden. Aufgrund von Literaturdaten war bekannt, dass die basische Region innerhalb der bZIP Domäne DNA Bindung vermittelt. Deshalb wurde ein Gelshift-Experiment durchgeführt, um die Bindungsaktivität des rekombinanten ABZ1 Wildtyp Proteins mit der einer ABZ1 Deletionsmutante (ABZ1₄₇₋₁₃₈) zu vergleichen.

Das deletierte Protein umfasst die Aminosäuren 47 bis 138 des Wildtyp ABZ1 (Kapitel 2.13.1). Folglich verfügt es nicht mehr über den 46 Aminosäure langen N-Terminus, der die basische Domäne beinhaltet. Als radioaktiv markiertes DNA Fragment wurde RBSS1, das als Zielsequenz für ABZ1 aus dem Random Binding Site Selection Assay

hervorgegangen war, eingesetzt (Kapitel 2.14.2.1). Die Protein-DNA-Bindungsansätze wurden in einem 9%igen nicht denaturierenden Polyacrylamidgel aufgetrennt (Kapitel 2.14.3).

Abbildung 14 zeigt die Ergebnisse der Protein-DNA-Interaktionen der einzelnen Reaktionsansätze. Fehlt Protein kann kein retardierter Komplex detektiert werden (Spur 1). Nach Zugabe von ABZ1 tritt, wie erwartet, ein retardierter Komplex aus ABZ1 und RBSS1 Sonde auf (K, Spur 2). Die Zugabe von ABZ1₄₇₋₁₃₈ statt des Wildtyp ABZ1 führt zu keinem geshifteten Komplex (Spur 3). Offensichtlich kann ABZ1₄₇₋₁₃₈ aufgrund seiner N-terminalen Deletion nicht an das RBSS1-Fragment binden. Folglich konnte die DNA-Bindungsdomäne von ABZ1 im Bereich der 46 N-terminalen Aminosäuren experimentell lokalisiert werden.

3.3.7 Die DNA-Bindung durch ABZ1 erfordert ein Dimer, dessen Monomere über funktionsfähige basische Domänen verfügen

ABZ1 bindet spezifisch an DNA Sequenzen (Kapitel 3.3.4 und 3.3.5). Nach Deletion des N-Terminus, der die basische DNA Bindungsdomäne des bZIP Transkriptionsfaktors einschließt, zeigt ABZ1 keine Interaktion mit DNA (Kapitel 3.3.6). Da das deletierte Protein jedoch noch einen Leucin-Zipper besitzt, der eine Protein-Protein-Interaktion ermöglicht, soll untersucht werden, ob die ABZ1 Mutante eine Protein-Interaktion eingeht, und welchen Einfluß diese dann auf die DNA Bindung hat. Daher sollte in einem Gelshift-Experiment die DNA Bindung durch gemeinsamen Zusatz von Wildtyp-Protein (ABZ1) und Deletionsmutante (ABZ1₄₇₋₁₃₈) analysiert werden.

Rekombinantes ABZ1 wurde zusammen mit ansteigenden Konzentrationen an rekombinantem ABZ1₄₇₋₁₃₈ in einer DNA-Bindungsreaktion inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze in einem 9%igen nativen Polyacrylamidgel aufgetrennt. Als Sonde diente das RBSS1-Fragment, das als Zielsequenz für ABZ1 aus dem Random Binding Site Selection Assay hervorgegangen war (Kapitel 2.14).

In Abbildung 14 auf den Spuren 4 bis 6 sind Reaktionsansätze aufgetrennt, die den ABZ1-Wildtyp-Protein sowie das deletierte Protein enthalten, wobei das deletierte Protein in steigender Konzentration zugegeben wurde. Es wird ein Protein-DNA-Komplex retardiert, dessen Laufverhalten mit dem des ABZ1-RBSS1-Komplexes vergleichbar ist und folglich auf Bindung von ABZ1 an die Sonde zurückgeführt werden kann (Abb. 14, vgl. Spur 2 und 4). Wäre ABZ1₄₇₋₁₃₈ an der DNA-Bindung beteiligt, wären zusätzliche Komplexe zu erwarten. Aufgrund der unterschiedlichen Molekulargewichte und Nettoladungen von ABZ1 und ABZ1₄₇₋₁₃₈ würden mögliche Protein-DNA Komplexe mit ABZ1₄₇₋₁₃₈-Homodimeren bzw. mit Heterodimeren aus ABZ1 und ABZ1₄₇₋₁₃₈ nämlich ein

schnelleres Laufverhalten zeigen als das an DNA gebundene ABZ1 Homodimer. Die mit steigender ABZ1₄₇₋₁₃₈ Konzentration abnehmende Signalstärke des ABZ1-RBSS1-Komplexes (Spuren 4-6), deutet auf eine Interaktion zwischen Wildtyp- und deletiertem Protein hin. Dadurch werden ABZ1 Moleküle aus der Bindungsreaktion heraustritiert, und es werden weniger ABZ1-ABZ1 Dimere gebildet, die an die Zielsequenz binden können. Dieses Experiment liefert indirekte Hinweise auf eine Dimerbildung von ABZ1. Aus diesen Beobachtungen resultiert einerseits, dass der 46 Aminosäuren lange N-terminale Bereich von ABZ1 nicht an der Protein-Protein-Interaktion beteiligt ist. Andererseits scheint für eine ABZ1-DNA Interaktion *in vitro* ein ABZ1-Dimer essentiell zu sein, dessen Monomere beide über die basische DNA Bindungsdomäne verfügen müssen.

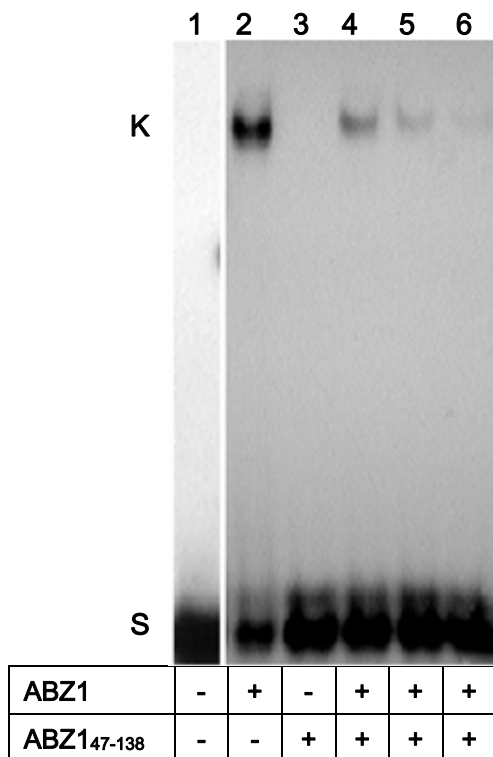


Abb.14: Elektrophoretischer Gelshift Assay zur Identifizierung der DNA-Bindungsdomäne von ABZ1. 0,05 ng radioaktiv markiertes RBSS1 Fragmente wurde entweder mit (+) oder ohne Zusatz von rekombinantem Protein (-; Spur 1) inkubiert. Spur 2: wie Spur 1 nach Zusatz von 1 µg ABZ1. Spur 3: wie Spur 1 mit 1,5 µg ABZ1₄₇₋₁₃₈. Spuren 4-6: wie Spur 2 nach Zusatz von 1,5 µg, 2,1 µg und 2,5 µg ABZ1₄₇₋₁₃₈. K: retardierter Protein-DNA Komplex; S: freie Sonde.

3.3.8 ABZ1 bildet *in vitro* Dimere

Bisher konnten nur indirekte Hinweise auf eine Dimerisierung von ABZ1 erhalten werden (Kapitel 3.3.7). Die Experimente zur DNA-Bindung von ABZ1 setzen jedoch eine Dimerbildung voraus (Kapitel 3.3.4). Daher sollte die Fähigkeit von ABZ1 zur Dimerisierung *in vitro* durch ein weiteres Gelshift-Experiment gezeigt werden, in dem das gebildete Dimer direkt nachgewiesen wird (Kapitel 2.14.3).

Für diese Analyse auf Dimerbildung wurde rekombinantes und aufgereinigtes Wildtyp-ABZ1 sowie eine Mutante von ABZ1 eingesetzt (ABZ1₁₋₁₀₀; Kapitel 2.13). Die Mutante

zeichnet sich durch die Deletion des C-Terminus von ABZ1 aus, wodurch ein Protein entsteht, das die 100 N-terminalen Aminosäuren von ABZ1 enthält. ABZ1₁₋₁₀₀ verfügt also über die basische DNA-Bindungsdomäne sowie den Leucin-Zipper zur Protein-Protein-Interaktion. Als radioaktiv markiertes DNA Fragment wurde RBSS1 eingesetzt, das als Zielsequenz für ABZ1 aus dem Random Binding Site Selection Assay hervorgegangen war (Kapitel 3.3.4). Die Auftrennung der Reaktionsansätze erfolgte im nativen 9%igen Polyacrylamidgel.

Abbildung 15 zeigt das Autoradiogramm der aufgetrennten Protein-DNA-Bindungsansätze. Der Reaktionsansatz, der lediglich die Sonde ohne Zusatz von Proteinen enthält, führt zu keinem retardierten Komplex, so dass ausschließlich die freie Sonde detektiert wird (S). ABZ1 und ABZ1₁₋₁₀₀ binden an das RBSS1-Fragment (Spuren 2 und 4). Die entstehenden Protein-DNA-Komplexe (K1 und K2) zeigen aufgrund der unterschiedlichen molaren Massen und Ladung der beiden Proteine ein unterschiedliches Laufverhalten im nativen Polyacrylamidgel. Nach gemeinsamer Inkubation des Wildtyp- und des mutierten ABZ1 mit dem RBSS1-Fragment wird neben den beiden Komplexen K1 und K2 ein dritter Protein-DNA Komplex (K3) detektiert, der im Polyacrylamidgel schneller als K1, aber langsamer als K2 läuft. Diese Beobachtung ist auf eine Bindung von Dimeren aus ABZ1 und ABZ1₁₋₁₀₀ Monomeren an RBSS1 zurückzuführen. Folglich wurde durch dieses Gelshift Experiment demonstriert, dass ABZ1 *in vitro* dimerisieren kann.

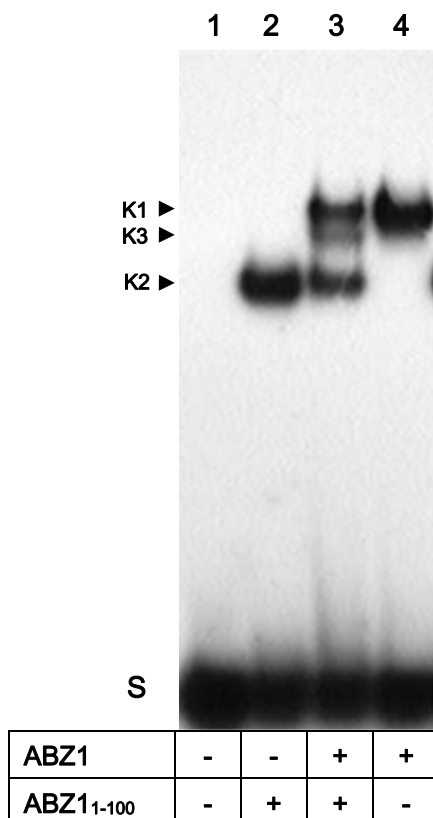


Abb. 15: Autoradiogramm einer Gelshift-Analyse zum Nachweis der Dimerbildung von ABZ1. Es wurden 0,1 ng radioaktiv markiertes RBSS1 Fragment (4×10^3 cpm), 1 μ g ABZ1 bzw. 770 ng der ABZ1₁₋₁₀₀ für die Bindungsreaktionen eingesetzt (+) bzw. nicht zugefügt (-). Die Protein-DNA Komplexe ABZ1-RBSS1 (K2), ABZ1₁₋₁₀₀-RBSS1 (K1) und ABZ1+ABZ1₁₋₁₀₀-RBSS1 (K3) werden entsprechend ihrer Größe und Ladung retardiert.

3.3.9 Coexpression von ABZ1 führt zu reduzierter Aktivität des CaMV 35S Promotors

ABZ1 besitzt, basierend auf der *in silico* Sequenzanalyse, keine Domäne zur Transkriptionsaktivierung, bindet aber spezifisch an den CaMV 35S Promotor (Kapitel 3.3.1 und 3.3.5). Um Aufschluß darüber zu erlangen, ob ABZ1 transkriptionsaktivierend oder -reprimierend auf den CaMV 35S Promotor wirkt, wurde dieser anaerob induzierte bZIP Faktor in einem Cotransformations-Experiment unter aeroben Bedingungen funktionell analysiert.

Tabakblätter wurden unter Verwendung der Partikelkanone mit einem ABZ1-Konstrukt als Effektor sowie dem Promotor-Reportergen-Konstrukt 35S-GUS cotransformiert (Kapitel 2.15.2). Als Transformationskontrolle wurde ein Konstrukt aus C1 Promotor und Luciferasegen verwendet. C1 ist der Promotor des *cab11* Gens aus der Zuckerrübe, der in Tabakblättern Reportergenexpression vermittelt (Acc. No. EP 1 207 204 A1; Dietmar Stahl, Einbeck, pers. Mitteilung). Der C1 Promotor besitzt keine ACGT Core Sequenz und stellt folglich keine Zielsequenz für ABZ1 dar. Diese Eigenschaften des C1 Promotors sind wichtig, da das C1-LUC-Konstrukt als Transformationskontrolle dient und unabhängig vom möglicherweise trans-regulatorischen ABZ1 exprimiert werden soll. In einem ersten Versuchsansatz wurde ein Effektorkonstrukt eingesetzt, dessen ABZ1 Expression durch den CaMV 35S Promotor reguliert wurde. Da diese transienten Expressionsuntersuchungen jedoch auf einen reprimierenden Effekt des ABZ1 hindeuteten, wurde in einem zweiten Versuchsansatz der CaMV 35S Promotor upstream des ABZ1-Gens durch den C1 Promotor ersetzt. Dadurch sollte eine mögliche Autoregulation der ABZ1 Expression unterbunden werden.

In Abbildung 16 sind die β -Glucuronidase-Aktivitäten der Cotransformations-Versuche zusammengefaßt. Die Anzahl der Meßwerte, die zur Berechnung der Mittelwerte und Standardabweichungen herangezogen wurden, sind für jedes einzelne Experiment aufgeführt (Anhang 7.3.1 und 7.3.2). Die Cotransformation der 35S-ABZ1 und 35S-GUS Konstrukte führt zu einer verringerten GUS-Expression im Vergleich zur Transformation ohne Effektor (Abb. 16A, vgl. -/35S-GUS mit 35S-ABZ1/35S-GUS). In Gegenwart von ABZ1 zeigt der 35S Promotor eine um ca. 40% reduzierte Aktivität. Wird ein Fusionskonstrukt aus der GAL4 Aktivierungsdomäne aus *Saccharomyces cerevisiae* und ABZ1 als Effektor (35S-GAL4-ABZ1) cotransformiert, wird eine gesteigerte GUS-Expression im Vergleich zum Ansatz mit 35S-ABZ1 beobachtet (Abb. 16A, vgl. 35S-GAL4-ABZ1/35S-GUS mit 35S-ABZ1/35S-GUS). Abbildung 16B zeigt die Ergebnisse des zweiten Cotransformations-Experimentes, in dem die Expression des Effektors durch den C1 Promotor kontrolliert wird. Die Coexpression von C1-ABZ1 und 35S-GUS

verursacht, im Vergleich zum Ansatz ohne Effektor, wiederum eine Abnahme der Reporterexpression (Abb. 16B, vgl. -/35S-GUS mit C1-ABZ1/35S-GUS). Infolge der Cotransformation des 35S-GUS Konstrukts mit einem Fusionskonstrukt zwischen der GAL4 Aktivierungsdomäne und ABZ1 wird ein Anstieg der GUS-Aktivität verzeichnet (Abb. 16B, vgl. C1-ABZ1/35S-GUS mit C1-GAL4-ABZ1/35S-GUS).

Aus den Ergebnissen dieser beiden unabhängigen Versuchsansätze resultiert, dass der ABZ1 Transkriptionsfaktor reprimierend auf den CaMV 35S Promotor im transienten Tabaksystem. *In vivo* könnte ABZ1 also als Repressor wirken, der die Genexpression unter Anaerobiose herunterreguliert.

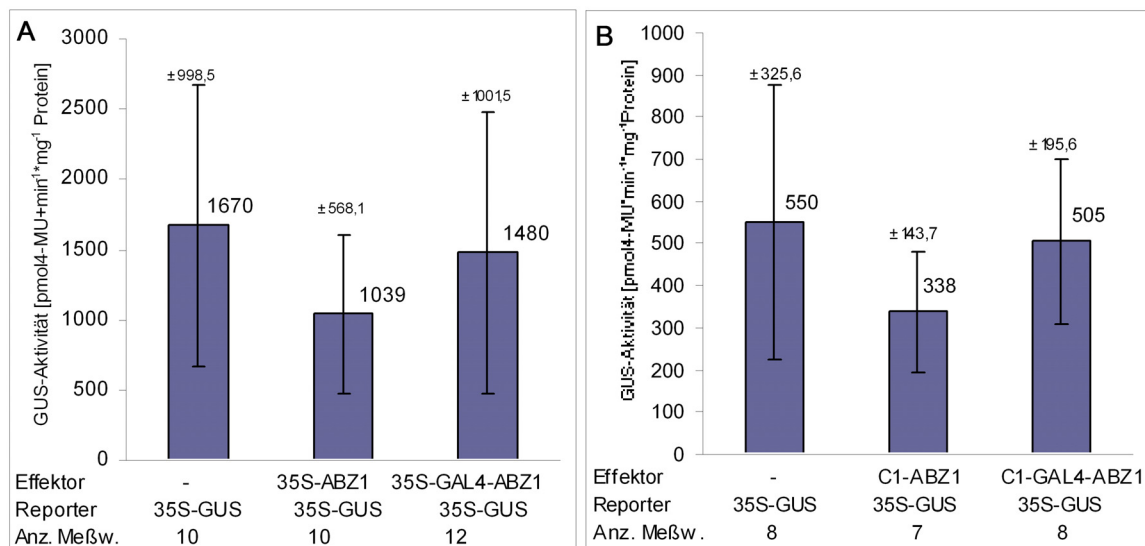


Abb. 16: Cotransformations-Experiment zur Untersuchung des Einflusses von ABZ1 auf den CaMV 35S Promotor. Blattmaterial von Tabak wurde transient durch die Partikelkanone mit einem Effektor-, einem Reporter- und einem Kontrollplasmid cotransformiert. Die Expression des Effektors wird durch den 35S Promotor (A) oder den C1 Promotor (B) reguliert. Nach aerober Inkubation wurde die Reporter-Gen-Aktivität in einem quantitativen β -Glucuronidase Test bestimmt und relativ zur Expression des Kontrollplasmids quantifiziert. Die Anzahl der zur Berechnung der Mittelwerte und Standardabweichungen einbezogenen Meßwerte ist angegeben. Die Mittelwerte der gemessenen GUS-Aktivitäten sowie ihre Standardabweichungen sind in [pmol 4-MU·min⁻¹·mg⁻¹ Protein] aufgetragen. -: Plasmid ohne Effektor, aber mit entsprechendem Promotor.

3.3.10 Der CaMV 35S Promotor wird unter Anaerobiose schwächer exprimiert als unter aeroben Bedingungen

ABZ1 ist ein bZIP Transkriptionsfaktor, dessen Expression infolge von Anaerobiose induziert wird, an den CaMV 35S Promotor bindet und diesen unter aeroben Bedingungen herunterreguliert (Kapitel 3.1.1, 3.3.5 und 3.3.9). Aufgrund dieser Beobachtungen wurde angenommen, dass der CaMV 35S Promotor bei Anaerobiose schwächer exprimiert wird als unter aeroben Bedingungen. Daher sollte die Aktivität eines Promotor-Reportergen-Konstruktes (35S-GUS) nach transienter Transformation in Tabak- bzw. Tomatenblätter unter anaeroben Bedingungen untersucht werden.

Blattmaterial von Tabak und Tomate wurde mit einem Reporterkonstrukt (35S-GUS) und einem Plasmid zur Transformationskontrolle (35S-LUC) cotransformiert. Ein Teil des durch die Partikelkanone transformierten Pflanzenmaterials wurde zur transienten Proteinexpression aerob und der andere Teil anaerob inkubiert (Kapitel 2.15.2). Die GUS-Aktivität unter normalen Sauerstoffbedingungen wurde mit der unter Anaerobiose verglichen. Als Maß für die Effizienz jedes einzelnen Transformationsereignisses wurden ausschließlich die gemessenen Luciferase-Einheiten der aerob inkubierten Explantate herangezogen. Dadurch blieb eine anaerobe LUC-Expression, die ebenfalls durch einen 35S Promotor kontrolliert und so evtl. bei Anaerobiose herunterreguliert wird, für die Berechnung der Reportergen-Aktivität unberücksichtigt.

Die Säulendiagramme in Abbildung 17 zeigen die Ergebnisse der vergleichenden Analysen in Tabak (A) und Tomate (B). Die GUS-Aktivität des anaerob inkubierten Blattmaterials ist in prozentualer Relation zur GUS-Aktivität unter aeroben Bedingungen, die auf 100% gesetzt wurde, dargestellt. Den Mittelwerten und Standardabweichungen lagen bei Tabak 7 und bei Tomate 6 Meßwerte von jeweils 8 Transformationsereignissen zugrunde (Anhang 7.4). In transient transformiertem Tabakblattmaterial sinkt die GUS-Aktivität unter anaeroben Bedingungen um ca. 86% auf 14%. Die GUS-Aktivität des transient transformierten Tomatenblattmaterials beträgt nach anaerober Inkubation noch ca. 50% des aerob inkubierten Pflanzenmaterials. Daraus wird geschlossen, dass die Aktivität des CaMV 35S Promotors sowohl in Tabak als auch in Tomate unter anaeroben Bedingungen schwächer ist. Daher wäre es möglich, dass anaerob induzierte Transkriptionsfaktoren, wie z.B. ABZ1, in die negative Regulation des CaMV 35S Promotors, involviert sind.

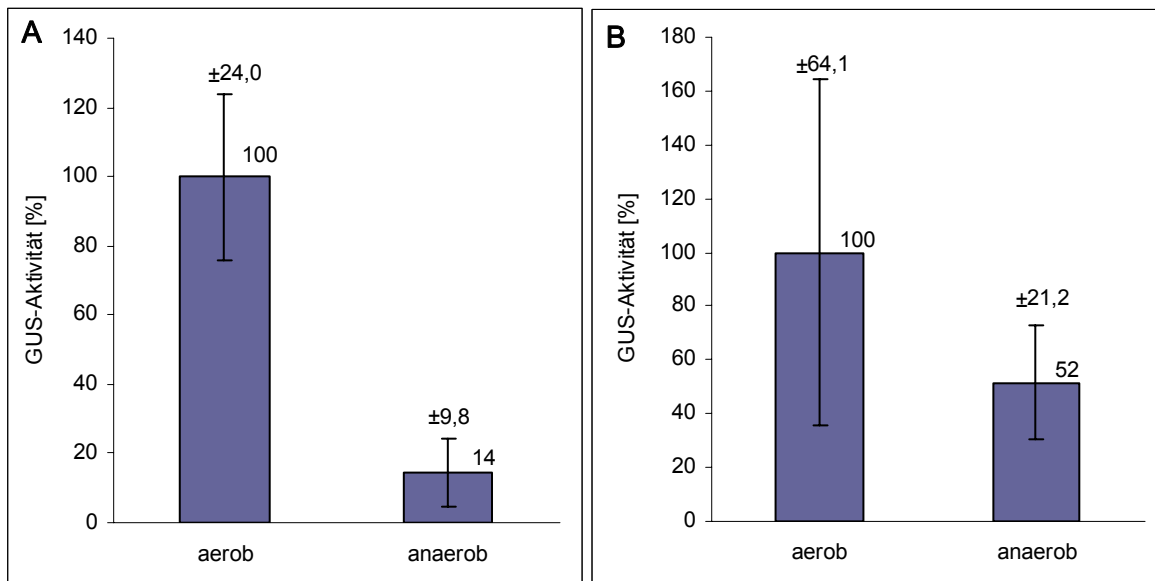


Abb. 17: Experiment zur Untersuchung des Einflusses von Anaerobiose auf den CaMV 35S Promotor. Blattmaterial von Tabak (A) und Tomate (B) wurde transient durch die Partikelkanone mit einem Reporter- und einem Kontrollplasmid transformiert. Nach aerober bzw. anaerober Inkubation wurde die Reporter-gen-Aktivität in einem quantitativen β -Glucuronidase Test bestimmt und relativ zur Expression des Kontrollplasmids quantifiziert. Die GUS-Aktivität des anaerob inkubierten Blattmaterials ist relativ zur Aktivität des aeroben Blattmaterials in Prozent sowie unter Angabe der entsprechenden Standardabweichungen aufgetragen.

3.3.11 Die Effekte der Anaerobiose auf den CaMV 35S Promotor in transgenen Tomatenpflanzen sind heterogen

Der reprimierende Effekt der Anaerobiose auf den 35S Promotor, der in transient transformiertem Blattmaterial von Tabak und Tomate beobachtet wurde (Kapitel 3.3.10), sollte im transgenen System untersucht werden.

Gesamt-RNA aus aerob und anaerob inkubierten transgenen Tomatenpflanzen, die das β -Glucuronidasegen unter der Kontrolle des CaMV 35S Promotors enthielten (35S-GUS), wurde mit einem 540 bp großen *Hind*III Fragment des GUS-Gens aus pRT103-GUS als Sonde hybridisiert (Kapitel 2.10). Es wurden fünf transgene Linien, die das Konstrukt 35S-GUS trugen, sowie eine Linie mit einem transformierten *GapC4*-GUS Konstrukt als Kontrolle untersucht. In transient transformierten Mais Suspensionszellen sowie in stabil transformierten Kartoffel- und Tabakpflanzen vermittelt der *GapC4* Promotor aus Mais eine starke anaerob spezifische Genexpression (Köhler *et al.*, 1995; Bülow *et al.*, 1999; Geffers *et al.*, 2000). Die Nummerierung der transgenen Tomatenlinien erfolgte entsprechend der Labor-internen Bezeichnungen.

In Abbildung 18 sind die Autoradiogramme der Expressionsanalyse des GUS-Reportergens zusammengestellt. Die Linien 2 und 4 zeigen, entgegen den Ergebnissen

im transienten System, eine Induktion der Genexpression unter anaeroben Bedingungen, während die GUS-Transkriptmengen der Linie 3 nach aerober und anaerober Inkubation vergleichbar sind und für Linie 8 keine Expression detektiert werden kann. Lediglich Linie 5 zeigt einen Rückgang der Reporterexpression infolge anaerober Inkubation. In der *GapC4*-GUS Kontrollpflanze wird, wie erwartet, erst durch anaerobe Inkubation die GUS-Expression induziert.

Zusammenfassend wird festgestellt, dass der Aktivitätsvergleich des CaMV 35S Promotors unter aeroben und anaeroben Bedingungen in transgenen Tomatenpflanzen heterogen ausfällt. Im Gegensatz zum transienten System wurde lediglich eine von fünf transgenen Linien beobachtet, die unter anaeroben Bedingungen eine herunterregulierte 35S Promotor-Aktivität aufweist.

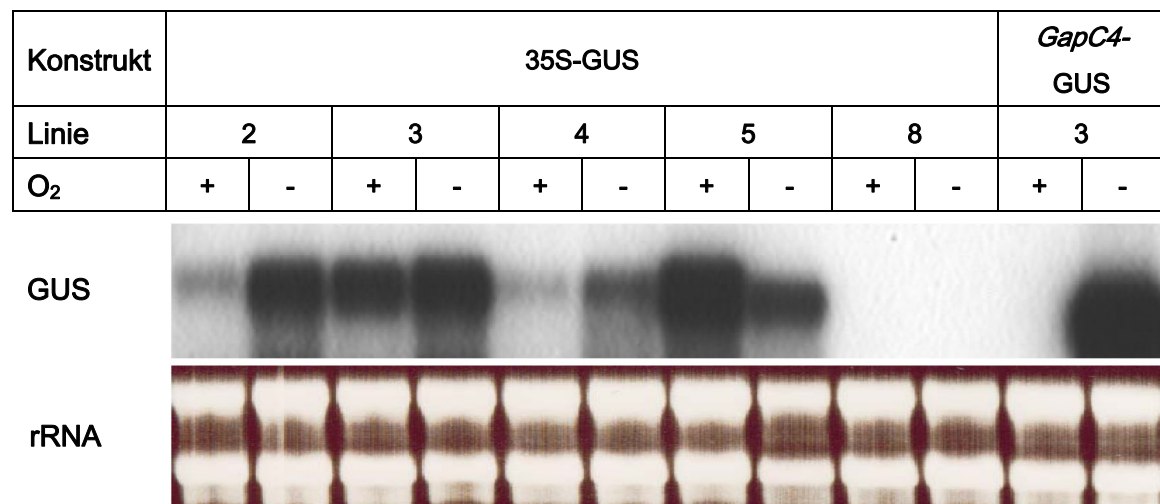


Abb. 18: Untersuchung der Aktivität des CaMV 35S Promotors in transgenen 35S-GUS Tomatenpflanzen unter aeroben Bedingungen sowie unter Anaerobiose. Gesamt-RNA aus aerobem (+) und anaerob inkubiertem (-) Pflanzengewebe wurde mit einem 540 bp großen *Hind*I Fragment des GUS Gens als Sonde hybridisiert (GUS). Als Expressionskontrolle wurde eine transgene *GapC4*-GUS Pflanze analysiert. Die Beladung des Gels ist durch Ethidiumbromid-Färbung der ribosomalen RNA gezeigt (rRNA).

3.3.12 Selektion von potentiellen Interaktionspartnern des ABZ1

bZIP Transkriptionsfaktoren binden als Dimere spezifisch an DNA-Zielsequenzen (Kapitel 3.3.7 und 3.3.8). Dabei können sie über ihren Leucin-Zipper Homo- oder Heterodimere bilden. Durch einen Screen nach interagierenden Peptidsequenzen sollen potentielle Interaktionspartner des ABZ1 im Hefe Two Hybrid System identifiziert werden (Kapitel 2.17).

Die mit ABZ1 interagierenden Proteine müssen, wie ABZ1 selbst, unter Anaerobiose exprimiert werden. Daher wurde in einem sog. Prey Vektor eine Expressionsbank aus cDNA Fragmenten, die aus mRNA anaerob inkubierter Tomatenpflanzen gewonnen wurden, synthetisiert (Kapitel 2.17.2). Der Prey Vektor exprimiert bei Klonierung der cDNA-Fragmente im richtigen Leseraster Fusionsproteine mit der GAL4 Aktivierungsdomäne aus *Saccharomyces cerevisiae*. Als Bait Konstrukt diente ein Fusionsprotein aus der GAL4 DNA Bindungsdomäne und einem ABZ1 Peptid von Aminosäure 47 bis 138, das den Leucin-Zipper, aber nicht die basische Domäne umfasst (ZIP, Kapitel 2.17.1). Seine Expression in Hefe wurde durch eine Western Blot Analyse nachgewiesen (Daten nicht gezeigt).

Von 1×10^5 gescreenten Klonen der Prey Expressionsbank wuchsen 154 Klone auf 4-fachem Selektionsmedium QDO (SD-Trp/-Leu/-His/-Ade). Zur Eliminierung falscher Positiver wurden diese Klone noch zweimal auf QDO Medium ausgestrichen und auf Aktivität des dritten Reportergens (*lacZ*) durch qualitative β -Galactosidase Assays untersucht. PCR-Analysen der Inserts und Retransformationsuntersuchungen der isolierten Prey Plasmide dienten ebenfalls der Verifizierung der interagierenden Peptide (Daten nicht gezeigt). Schließlich wurden 6 Klone identifiziert, die reproduzierbar die Genexpression der beiden Nährstoffselektionsmarker Adenin und Histidin sowie des β -Galactosidase Reportergens in Hefe aktivierten. Die Sequenzierung der 6 isolierten Prey-Konstrukte bestätigte, dass diese tatsächlich Fusionsproteine mit der GAL4 Aktivierungsdomäne exprimieren. Nachfolgend werden die Aminosäuresequenzen (Daten nicht gezeigt) und die resultierenden Homologien der selektierten Prey-Peptide kurz erläutert.

Das erste Peptid umfasst 90 Aminosäuren und zeigt die höchste Homologie mit einer Sequenzidentität von 53% zu einem EXO70 Protein aus *Arabidopsis thaliana*, das eine Untereinheit des Exocytosekomplexes darstellt (locus AT5G50380.1). Zuerst in *Saccharomyces cerevisiae* entdeckt (TerBush *et al.*, 1996), wurde die Exocytose Untereinheit Exo70 auch in anderen Eukaryoten untersucht (Kee *et al.*, 1997). Ein zweiter im Hefe Two Hybrid Screen selektierter Klon codiert ein 170 Aminosäuren langes Peptid mit einer 52%igen Sequenzidentität zu einem 224 Aminosäuren umfassenden

IDS4-like Protein aus *Castanea sativa* (AAL17697; Schafleitner und Wilhelm, 2002). Der N-Terminus des IDS4-like Peptids aus Tomate von Aminosäure 9 bis 66 ist einer 180 Aminosäuren langen SPX Domäne sehr ähnlich (Pfam Acc. No. PF03105). Das Hefeprotein SYG1, das die SPX- Domäne enthält, bindet mit seinem N-Terminus direkt an eine G-Protein β -Untereinheit und inhibiert die Signaltransduktion eines Paarungspheromons (Spain, 1995). Es wird vermutet, dass alle Proteine dieser Familie mit SPX-Domäne in die G-Protein assoziierte Signaltransduktion involviert sind. Außerdem sind die N-Termini verschiedener Proteine der Familie mit SPX-Domäne an der Regulation des Phosphat-Transports beteiligt. Zwei der im Hefe Two Hybrid Screen selektierten Klone weisen Homologien zu 1-Aminocyclopropan-1-carboxylat (ACC) Oxidasen auf. Ein Alignment ihrer Nucleotidsequenzen bestätigt, dass sie Klone derselben ACC Oxidase sind. Der mit 128 Aminosäuren kleinere der beiden Klone besitzt an seinem N-Terminus 9 zusätzliche Aminosäuren im Vergleich zum 161 Aminosäuren langen ACC Oxidase Peptid. Das rekonstruierte 170 Aminosäuren umfassende Peptid zeigt eine 92%ige Sequenzidentität mit einer 312 Aminosäuren langen ACC Oxidase aus *Solanum tuberosum* (AAM29183, Zanetti *et al.*, 2002). Die ACC Oxidasen aus Tomate gehören einer Genfamilie an, von der bereits 4 Mitglieder bekannt sind. Das hier isolierte ACC Oxidase Peptid zeigt mit 53%iger Sequenzidentität die höchste Homologie zu LE-ACO4 (BAA34924; Nakatsuka *et al.*, 1998) und stellt somit ein fünftes Mitglied dieser Genfamilie dar. Ein viertes mit ABZ1 interagierendes Peptid enthält 202 Aminosäuren und zeigt eine 64%ige Sequenzidentität zum C-Terminus (AS 932-1133) eines Transducins aus *Arabidopsis thaliana*. Dieses Protein gehört zur WD40 Repeat Protein Familie und umfasst 1344 Aminosäuren (NP_187938). Ein weiterer im Hefe Two Hybrid Screen selektierter Klon exprimiert ein 148 Aminosäuren langes Peptid. Seine 102 C-terminalen Aminosäuren weisen eine 67%ige Sequenzidentität zu einer putativen Untereinheit der ATP-Synthase aus *Glycine max* auf, die 179 Aminosäuren umfasst (CAA52349; Smith *et al.*, 1994). Ein relativ kurzes Peptid, das mit ABZ1 im Hefe Two Hybrid System interagiert, umfasst lediglich 59 Aminosäuren und zeigt keine signifikante Homologie in der Datenbank.

Zur Quantifizierung der Interaktionsstärke zwischen ABZ1 und den selektierten Peptiden wurde ein β -Galactosidase Assay durchgeführt (Kapitel 2.17.7).

In Abbildung 19 ist die quantitative Aktivität des β -Galactosidase Reportergens der untersuchten Klone relativ zur Positivkontrolle in Prozent dargestellt. Der als Positivkontrolle eingesetzte Hefestamm exprimiert die interagierenden Proteine Murin p53 und SV40 large T-Antigen (p53+T). Als Negativkontrolle wurde ein mit Lamin C als Bait- und T-Antigen als Prey-Konstrukt cotransformierter Hefestamm verwendet (Lam+T). Die Hintergrund-Aktivität, die durch das eingesetzte Bait-Konstrukt (ZIP)

verursacht wird, liegt bei 7,23% der Aktivität der Positivkontrolle. Die selektierten Prey Konstrukte zeigen nach Transformation in Hefe ebenfalls eine vernachlässigbar geringe Hintergrund-Aktivität (Daten nicht gezeigt). Für die Klone, die die Leucin-Zipper Domäne von ABZ1 als Bait und eines der selektierten Prey Konstrukte coexprimieren (ATP-Synth., unknown, ACC-Oxid., Exo70, IDS4-like und Transducin), wird eine β -Galactosidase Aktivität von 50-82% im Vergleich zur Positivkontrolle gemessen. Die Mittelwerte der prozentualen Reporterogenaktivitäten beruhen auf mindestens 6 Meßwerten und sind gemeinsam mit den errechneten Standardabweichungen aufgeführt (Anhang 7.5).

Daraus folgt, dass die im Two Hybrid Screen selektierten Peptide in Hefe mit der Leucin-Zipper Domäne von ABZ1 interagieren und so die Expression des Reportergens aktivieren.

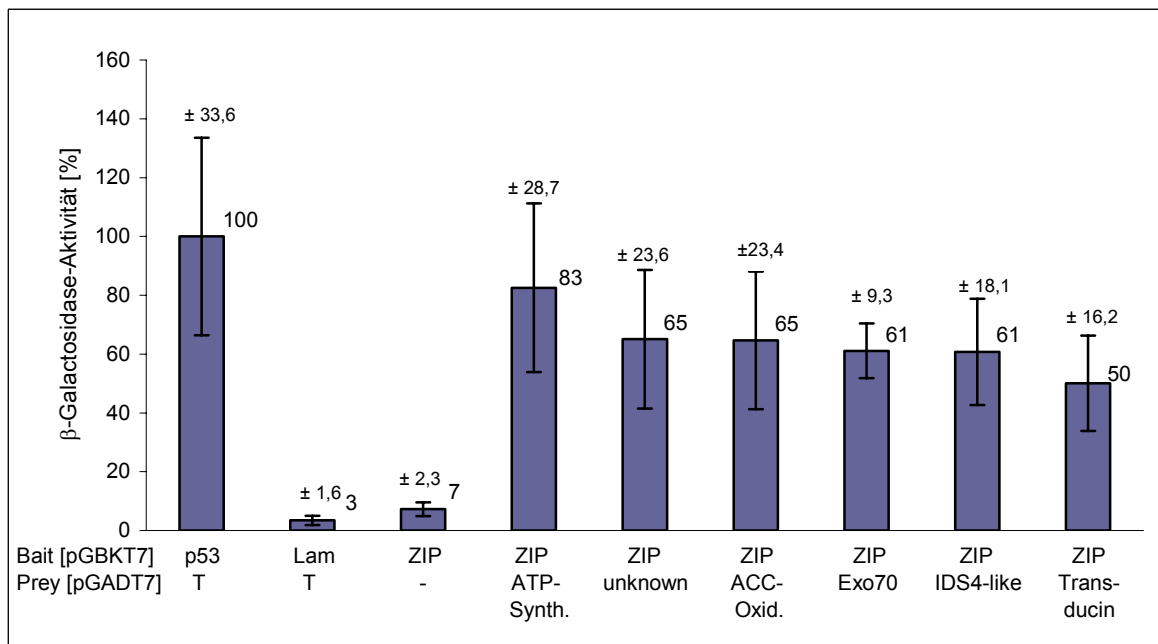


Abb. 19: Quantitative Bestimmung der β -Galactosidase-Aktivität als Maß für die Interaktionsstärke cotransformierter Bait- und Prey-Konstrukte in *Saccharomyces cerevisiae*. Die Mittelwerte der gemessenen Reporterogen-Aktivitäten sowie die entsprechenden Standardabweichungen sind relativ zur Positivkontrolle (p53+T) in Prozent angegeben. Bait-Konstrukte wurden in den Vektor pGBKT7 und Prey-Konstrukte in pGADT7 kloniert. Die einzelnen Konstrukte sind im Text erläutert.

bZIP Transkriptionsfaktoren interagieren über ihren Leucin-Zipper mit anderen Proteinen. Daher lag die Annahme nahe, dass auch die im Yeast Two Hybrid Screen selektierten Peptide, deren Interaktion mit ABZ1 durch den quantitativen β -Galactosidase Assay

verifiziert worden war, eine Leucin-Zipper Domäne besitzen müssten. Dies wurde anhand einer vergleichenden Sequenzanalyse überprüft.

In Abbildung 20 ist ein Alignment des ABZ1 Leucin-Zippers sowie der putativen Leucin-Zipper Domänen seiner interagierenden Peptide dargestellt. Leucine und Isoleucine, die in einem Abstand von 7 Aminosäuren auftreten, also dem Zipper-Motiv entsprechen, sind rot hervorgehoben. Andere Aminosäuren im korrekten Abstand des Leucin-Zippers sind fett dargestellt. Die interagierenden Peptide enthalten drei bis sieben Leucine bzw. Isoleucine im korrekten Abstand. Die Leucin-Zipper von ABZ1 und seiner interagierenden Peptide sind mindestens durch eine, aber höchstens durch drei Aminosäuren unterbrochen, die nicht Leucine oder Isoleucine sind. Diese Beobachtungen unterstützen die Annahme, dass die Interaktion zwischen ABZ1 und anderen Proteinen über ihre Leucin-Zipper Regionen erfolgt.

ABZ1	L TGEVSR L QGAN K N I VSKID E T T ERYA I CAAQNN V LRAQAME L TDR L RY L
TRANSDUCIN	T N L IS N C L NKDMP G L MEK L MM K ELAAVG Q AVAR S I T PAIE K T I SSA I EA
ATP-SYNTHASE	L SPQEV N E H SDRE I AS L GISS M ALAS R L SRSTR Q L XAGQ V L RPEH A P
IDS4-LIKE	L GRDIV D LHGEM V L XNYS A L N YTG V K I LKKY D K LSGELL R L PF I Q K V L
ACC-OXIDASE	P ASNI Y E I QGLS K E L CKAVDD Y IDQL I K LAEN L SE L MCEN L G LAKSY I K E
EXO70	V EREIS K K PTQ G GE I HPLTRY V MNY V K L VDYSD T L N GLLE K LES D TEY G
UNKNOWN	K PSKK V R E QTK V S A L VKS V AE V SNM R I K I VRLKW V L TLLQ Q N SSCE K S I V

Abb. 20: Alignment der ABZ1 Leucin-Zipper Domäne mit den putativen Leucin-Zipper Regionen seiner interagierenden Peptide. Leucine und Isoleucine im Zipper-Motiv sind rot hervorgehoben. Aminosäuren, die im Zipper-Motiv auftreten, aber keine Leucine oder Isoleucine sind, sind fett dargestellt.

Zusammenfassend wird festgestellt, dass ABZ1 mit verschiedenen Proteinen, die in die Signaltransduktion involviert sind, wie z.B. mit einem IDS4-like Protein oder mit einem Transducin-Homolog, interagieren kann.

3.3.13 Untersuchung der transkriptionellen Induktion von potentiellen ABZ1 Interaktionspartnern unter Anaerobiose

Die ACC-Oxidase und das IDS4-like Protein wurden durch einen Hefe Two Hybrid Screen aus einer anaeroben Expressionsbank als potentielle Interaktionspartner des Anaerobiose-spezifischen bZIP Transkriptionsfaktors ABZ1 isoliert. Um ihre transkriptionelle Induktion durch Anaerobiose zu untersuchen, wurden Northern Blot Analysen durchgeführt (Kapitel 2.10.4).

Gesamt-RNA aus Gewebe anaerob induzierter Tomatenpflanzen wurde mit radioaktiv markierten cDNA Fragmenten der ACC Oxidase bzw. des IDS4-like Proteins, die im Hefe Two Hybrid Screen selektiert worden waren, hybridisiert (Kapitel 2.17.3).

Das Autoradiogramm der Northern Blot Hybridisierungen ist in Abbildung 21 dargestellt. Sowohl die ACC Oxidase als auch das IDS4-like Protein werden ausschließlich unter anaeroben Bedingungen exprimiert. Die Transkriptgrößen liegen bei ca. 1 kb. Der gewebespezifische Northern Blot zur Expressionsanalyse der ACC Oxidase zeigt, dass die ACC Oxidase bevorzugt in den Tomatenfrüchten durch Anaerobiose induziert wird. Ihre Expressionsstärke ist im Blattmaterial deutlich geringer, und im Wurzelgewebe kann nahezu kein Transkript des ACC Oxidasegens detektiert werden.

Daraus resultiert, dass es sich sowohl bei der ACC Oxidase als auch dem IDS4-like Protein um Proteine handelt, die, wie ihr potentieller Interaktionspartner ABZ1, anaerob spezifisch exprimiert werden. Deshalb wird das IDS4-like Protein als AIL (anaerobes IDS4-like Protein) bezeichnet, während LeACO5 verdeutlicht, dass es sich hierbei um ein fünftes Mitglied der ACC Oxidase Familie aus *Lycopersicon esculentum* handelt.

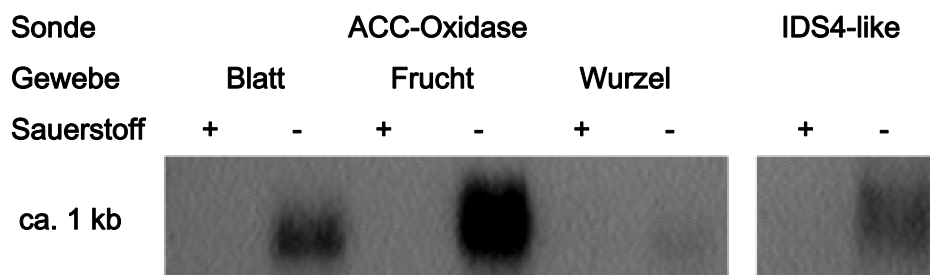


Abb. 21: Anaerob spezifische Transkriptionsinduktion der ACC Oxidase und des IDS4-like Proteins. Gesamt-RNA aus unterschiedlichen Geweben (Blatt, Frucht, Wurzel) bzw. einem Gemisch aller Gewebetypen aerober (+) und anaerob (-) inkubierter Tomatenpflanzen wurde mit radioaktiv markierten PCR-Fragmenten der selektierten Prey-Klone (ACC Oxidase und IDS4-like) hybridisiert. Die Größe der hybridisierenden Transkripte ist in Kilobasenpaaren [kb] angegeben. Die aufgetragenen RNA-Mengen wurden durch Ethidiumbromid-Färbung der rRNA überprüft und waren vergleichbar (Daten nicht gezeigt).

3.3.14 AIL ist ein potentieller Interaktionspartner von ABZ1 und enthält eine SPX-Domäne

Ein Peptid, das homolog zu einem IDS4-like Protein ist, wurde im Yeast Two Hybrid Screen als potentieller Interaktionspartner von ABZ1 identifiziert (Kapitel 3.3.12). Da dieses IDS4-like Protein aus Tomate anaerob spezifisch exprimiert wird (AIL, Kapitel 3.3.13) und vermutlich ein Mitglied einer Familie von Proteinen mit SPX-Domäne ist,

könnte AIL eine Rolle in der anaeroben Signaltransduktion spielen. Deshalb wurde ein vollständiger cDNA Klon dieses Proteins isoliert.

Dazu wurden ca. 200000 Kolonien einer cDNA-Bank (5×10^5 cfu/ml) aus anaerob inkubierten Tomatenpflanzen mit dem AIL cDNA-Fragment (Kapitel 2.17.3), das aus dem Hefe Two Hybrid Screen hervorgegangen war, gescreent. Von 24 positiven Klonen des ersten Screens wurden 8 in einem zweiten Screen vereinzelt und verifiziert. Nach *NotI/SalI* Spaltung wurde der Klon mit dem größten cDNA Insert sequenziert.

In Abbildung 22 ist die aus der Nucleotidsequenz resultierende Aminosäuresequenz des AIL Proteins dargestellt (unterste Zeile). Die vollständige cDNA umfasst 950 Basenpaare und schließt einen Poly-A Tail von 20 Adenosinresten ein (Daten nicht gezeigt). 798 Basenpaare (2-799) bilden den codierenden Bereich und werden in das AIL Protein mit 266 Aminosäuren translatiert. Das Molekulargewicht des AIL beträgt 30,8 kDa, und es hat einen p*K*_i-Wert von 6,22. Die 5' nicht translatierte Sequenz besteht aus lediglich einem Basenpaar, während die 3' UTR 151 Basenpaare beinhaltet. Durch Homologievergleich konnte sicher gestellt werden, dass das erste ATG dieses offenen Leserasters tatsächlich das Startcodon darstellt. Das selektierte, mit ABZ1 interagierende Peptid entspricht den Aminosäuren 90 bis 259 der vollständigen Aminosäuresequenz von AIL (Unterstreichung). Die höchste Homologie mit einer Sequenzidentität von 53% zeigt die vollständige Aminosäuresequenz mit einem 256 Aminosäuren langen IDS4-like Protein aus *Arabidopsis thaliana* (AT5G20150, Abb. 22; AMM64762, Haas *et al.*, 2002). Von Aminosäure 1 bis 255 zeigt AIL eine 37%ige Sequenzidentität mit der konservierten Domäne eines Proteins, das in die vakuoläre Polyphosphat-Akkumulation involviert ist, eine SPX-Domäne besitzt und für den Transport anorganischer Ionen verantwortlich ist. Die 150 N-terminalen Aminosäuren von AIL aus Tomate entsprechen mit einer 35%igen Sequenzidentität dem Aminoterminus der 180 Aminosäuren langen SPX Domäne (graue Unterlegung). Der putative Leucin-Zipper beginnt mit dem Leucin an Position 106, endet mit dem Leucin an Position 155 und besteht aus 6 Leucinen sowie einem Isoleucin, die im Abstand von sieben Aminosäuren auftreten (rot, Fettdruck). Mit Ausnahme des Leucins an Position 155 liegt der Leucin-Zipper von AIL, der potentiell mit ABZ1 interagiert, innerhalb der SPX-Domäne. Ein zweigeteiltes Kernlokalisierungssignal des AIL Proteins konnte mit Hilfe des Psort Computerprogrammes identifiziert werden und umfasst die Aminosäuren 29 bis 45 (Kursivdruck).

Außerdem zeigt Abbildung 22 ein Aminosäure-Alignment von AIL und vier Homologen aus *Arabidopsis thaliana* (loci AT5G20150, AT5G15330, AT2G45130, AT2G26660). Identische Aminosäuren an bestimmten Positionen sind mit einem Stern (*) und ähnliche mit einem Doppelpunkt (:) bzw. einem Punkt (.) gekennzeichnet (ClustalW; Kapitel 2.18).

Abb. 22: Alignment der Aminosäuresequenz von AIL aus Tomate und vier IDS4-like Homologen aus Arabidopsis. Identische (*) und ähnliche (: oder .) Aminosäuren sind gekennzeichnet. Das isolierte Hefe Two Hybrid Peptid (Unterstreichung), die SPX-Domäne (Unterlegung), der Leucin-Zipper (rot, Fettdruck) und das zweigeteilte Kernlokalisierungssignal (Kursivdruck) sind hervorgehoben.

AT5G20150 MKFGKSLSNQIEQTLPEWRQDKFLSYKELKKKLKLGISKTADRPVKRLRLRLEDS-----
AT2G26660 MKFGKSLSNQIEETLPEWRDKFLSYKELKKKLKLMPEPRSVENRPNKRSRSDSNSVDTDPT
AT2G45130 MKFGKRIKEQIQESLPEWRDKFLRYKELKNLISSPAV-----
AT5G15330 MKFGKEFRTHLEETLPEWRDKFLCYKPLKKLLKYYPYYSADFGPANSDHNDSRPVFADTT
AIL 1 MKFWKILKSHIEETLPEWRQDKFLSYKDLKKELKLIYPQ-DDRPIKKQRLNND-----
*** * : ::::****.*** ** *: :.

AT5G20150 -----VGISKEEINFIQLEDELEKFNFFVEKEEYIIRLKEFRDRIAK
AT2G26660 -----VGMTKEELDFISLLEDELEKFNSSFVEQEEYIIRLKELKDQVAK
AT2G45130 -----ESIFVGLLNAEIDKFNAFFVEQEEDFIHHKELQYRIQR
AT5G15330 NISSAADDGGVVPGVPSDELQGSFVRILNDELEKFNDFYVDKEEDFVIRLQELKERIEQ
AIL 53 -----LAKEVNDFVKLLLEEIDKFNTFFVEKEEDYIIHLKVLKERVAE
* : *: * :*: ** * :*:*:*:*: : : : : .

AT5G20150 AKDSM-----EKMIIKIRKEIVDFHGEMVLLENYSALNYTGLVKILKKYDKRTGDL
AT2G26660 AKNSN-----EEMINIKKEIVDFHGEMVLNMNYSALNYTGLAKILKKYDKRTGAL
AT2G45130 LVEKCGHNDEMS--RENISEIRKDIVNFHGEMVLNVNYSNINYTGLAKILKKYDKRTRGG
AT5G15330 VKEKNGEFASESEFSEEMMDIRRDVLTIHGEMVLKNYSSLNFAGLVKILKKYDKRTGGL
AIL 96 MGKSN-----EEVNRIGRDIVDLHGEMVLLENYSALNYTGVVKILKKYDKLSGEL
.. * : : :*: ***** ** * :*:*:***** :

AT5G20150 MRLPFIQKVLQPPFYTTDLLFKLVKESEAMLDQIFPAN-----
AT2G26660 IRLPFIQKVLQEPFFTTDLLNTFVKECEAMLDRLFPSNKSRLNDEEGEPTTSGMVKTGTD
AT2G45130 LRSFPIQKVLHQPFKTDLVSRVLREWETMDAVDPVK-----V
AT5G15330 LRLPFTQLVLHQPFFTTEPLTRLVRECEANLELLFPSEAEVVSSSAVQAHS----SSHQ
AIL 146 LRLPFHPKVLAEPPFFETEVLNKLVKEDTLLSHLLYQTEPLKVAGGGG-----GGG
:* ** ** :*: * : :*: * : : : .

AT5G20150 ETESEIIQAELSEHKFMESLHMKSTIAALRVLKEIRSGSSTVSVFSPLPPLQLNGLDET--
AT2G26660 DSELLRVPKELSEIEYMESLYMKSTVSALKVLKEIRSGSSTVSVFSPLPPLPASGLEDDSW
AT2G45130 AEAEGYERCAAVTSAAAGEGIFRNTVAALLTMKEMRRGSSTYSAFSLPPLNLSDSNDVLR
AT5G15330 HNSPRISAETSSTLGNENLDIYKSTLAAMRAIRGLQKASSTYNPLSFSSLLQNEDETDT
AIL 197 GERPVKVPQELAEIKNMENMYLRLTYLSALRVLQEMRSGSSTVSIFSLPMPKTNALDNV--
: * *: : : : .*** . :*: : . : :

AT5G20150 WKKIPLLEQEAK-----
AT2G26660 KKKVGVLEQVAK-----
AT2G45130 SLHLSSPIPIP-----
AT5G15330 AENSPNSGNKDDSEKEDTGPSH
AIL 255 WKNAPVVIQEAK-----
:

3.3.15 LeACO5 - ein neues Mitglied der ACC Oxidase Genfamilie aus Tomate

Im Hefe Two Hybrid Screen wurden zwei Klone als Interaktionspartner des ABZ1 isoliert, die eine hohe Homologie zu einer ACC Oxidase aus Kartoffel aufweisen (Kapitel 3.3.12). Da ein Vergleich ihrer Aminosäuresequenzen mit denen der vier aus Tomate bekannten ACC Oxidasen auf ein neues Mitglied der ACC Oxidase Familie in Tomate hinweisen, wurde ein vollständiger cDNA-Klon dieser anaerob induzierten ACC Oxidase (LeACO5) isoliert.

Ca. 200000 Kolonien einer anaeroben cDNA Bank (5×10^5 cfu/ml) aus Tomate wurden mit dem im Hefe Two Hybrid selektierten cDNA Fragment der LeACO5 als Sonde gescreent (Kapitel 2.17.3). Acht der 105 positiven Klone wurden in einem zweiten Screen vereinzelt und verifiziert. Nach Spaltung der isolierten Plasmide mit *NotI/SalI* wurde der Klon, der das größte cDNA-Insert trug, sequenziert.

Abbildung 23 (unterste Zeile) zeigt die von der cDNA Sequenz abgeleitete Aminosäuresequenz von LeACO5. Die vollständige cDNA Sequenz umfasst, inklusive des Poly-A Schwanzes mit 119 Adenosinresten, 1109 Basenpaare (Daten nicht gezeigt). Die 5' UTR besteht aus 25 Basenpaaren, während 181 Basenpaare die 3' UTR bilden. Die Basenpaare 26 bis einschließlich 928 codieren die LeACO5, die sich aus 301 Aminosäuren zusammensetzt. Ihr berechnetes Molekulargewicht beträgt 34,4 kDa und ihr p*K*_i-Wert 6,49. Das rekonstruierte Peptid, das sich aus den Sequenzen der beiden mit ABZ1 interagierenden Klone zusammensetzt, erstreckt sich über die Aminosäuren 37 bis 206 der vollständigen LeACO5 (Unterstreichung). Der mit ABZ1 interagierende Leucin-Zipper umfasst die Aminosäuren 101 bis 136 und enthält 4 Leucine und ein Isoleucin (rote Buchstaben), wobei das Motiv an Position 115 durch ein Tyrosin (Y) unterbrochen ist (Fettdruck). Über einen Sequenzbereich von Aminosäure 1 bis 292 besteht eine Identität von 31% zur konservierten Domäne der Eisen/Ascorbat Oxidoreduktase Familie. Mitglieder dieser Familie sind in die Biosynthese, den Transport und den Katabolismus von Sekundärmetaboliten involviert. Die Aminosäuresequenz des vollständigen cDNA-Klons weist eine 93%ige Identität mit einer ACC Oxidase aus *Solanum tuberosum* auf, die 312 Aminosäuren lang ist und durch Pathogeninfektion in der Kartoffel induziert wird (AAM29183; Zanetti *et al.*, 2002).

Bisher wurden vier ACC Oxidasen aus Tomate isoliert. Im Folgenden werden die bekannten ACC Oxidasen mit LeACO1-4 (P05116 und P07920, Holdsworth *et al.*, 1987; P24157, Spanu *et al.*, 1991; BAA34924, Nakatsuka *et al.*, 1998) bezeichnet.

Abbildung 23 zeigt weiterhin ein Alignment der Aminosäuresequenzen von LeACO5 und den vier bekannten ACC Oxidasen aus Tomate. Hoch konservierte Aminosäuren an

bestimmten Positionen der analysierten Sequenzen sind im Alignment mit einem Stern (*) und ähnliche Aminosäuren mit einem Doppelpunkt (:) bzw. einem Punkt (.) gekennzeichnet (ClustalW; Kapitel 2.18). Alle Mitglieder der Fe(II) Ascorbat Familie der Dioxygenasen besitzen neun Aminosäurereste, die hoch konserviert sind (Unterlegung; Lasserre *et al.*, 1996). Es wird deutlich, dass sich LeACO5 neben ihrer Größe auch hinsichtlich ihrer Primärstruktur am stärksten von den anderen ACC Oxidasen unterscheidet. Die höchste Sequenzidentität (50%) erreicht sie im Vergleich mit LeACO4. Der putative Leucin-Zipper von LeACO5, der vermutlich zu ihrer Interaktion mit ABZ1 beiträgt, liegt im Bereich von Aminosäure 101 bis 136 der vollständigen codierenden Sequenz (Fettdruck). Durch Vergleich dieser Region mit den entsprechenden Aminosäuren der anderen ACC Oxidasen wird festgestellt, dass das erste Isoleucin und das im Abstand von 7 Aminosäuren folgende Leucin spezifisch für LeACO5 sind. Die drei Leucine, die nach einem 13 Aminosäuren langen Spacer im Leucin-Zipper Motiv auftreten, sind jedoch in allen fünf ACC Oxidasen hoch konserviert (rot, Fettdruck). Die vergleichende Sequenzanalyse zeigt, dass es sich bei LeACO5 um eine fünfte ACC Oxidase aus Tomate handelt.

LeACO1		-MENFPIINLEKLN	GERANTMEMIKD	ACENWGFFELVNHGIPHEVMDTVEKMTKGHYKK				
LeACO2		-MENFPIINLEKLN	GAERVATMEKIND	ACENWGFFELVNHGIPHEVMDTVEKLTKGHYKK				
LeACO3		-MENFPIINLEN	LN	GERAKTMEIKD	ACENWGFFELVNHGIPHEVMDTVEKLTKGHYKK			
LeACO4		MESNFPVVD	MGLLQTEKRPEAMDKIKD	ACENWGFFELVNHGISHELLDAVENLTKGHYKK				
LeACO5	1	--MEM	PVIDFSKLEGEERCATMSLLHQ	ACEKWGFFMIENHGIDS	YLM	DNV	KQFVNQHYEA	
		:*:~::~	*:~::~	*:~::~	*:~::~	*:~::~	*:~::~	
LeACO1		CMEQRFKELVASKGLEAVQAEVTDLDWESTFFLRHLPTS	SNISQV	PDLDDEEY	REVMRDFAK			
LeACO2		CMEQRFKELVAKKGLEGVEVEVTDMDWESTFFLRHLPS	SNISQL	PDLDVY	REVMRDFRK			
LeACO3		CMEQRFKELVASKGLEAVQAEVTDLDWESTFFLRHLPTS	SNISQV	PDLDDEEY	REVMRDFAK			
LeACO4		CMEQRFKEMVASKGLEAVQTEIDDLWESTFFLKHL	PVSNVYE	V	PDLDDEEY	RKVMKDFAL		
LeACO5	59	NMKKRFYESELPMSLE-KNGNISNTD	WESTFFVWHRPASNIYE	I	QGLSKE	L	CKAVDDYID	
		*:~::~	*:~::~	*:~::~	*:~::~	*:~::~	*:~::~	
LeACO1		RLEKLAEE	LLD	LCENLGL	EKG	YLKNAFYGSKGPNFGTKVSNYP	PCPKPDLIKGLRAHTD	
LeACO2		RLEKLAEE	LLD	LCENLGL	EKS	YLKNTFYGSKGPNFGTKVSNYP	PCPKPDLIKGLRAHTD	
LeACO3		RLEKLAEE	LLD	LCENLGL	EKG	YLKNAFYGSKGPNFGTKVSNYP	PCPKPDLIKGLRAHTD	
LeACO4		RLEKLAEN	LLD	LCENLGL	EKG	YLKKA	FYGSKGPTFGTKVSNYP	PCPKPDLIKGLRAHTD
LeACO5	118	QLIKLAENLSE	LMCENLGL	AKSYIKEAFSGSKGPSVGT	KVAIY	Q	CP	RPDLVRGLREHTD
		*:~::~	*:~::~	*:~::~	*:~::~	*:~::~	*:~::~	*:~::~
LeACO1		AGGIILLFQDDKVSGLQLLKDEQWIDVPPMRHS-IVVNLGDQLE	VITNGKYKSVL	HRVIA				
LeACO2		AGGIILLFQDDKVSGLQLLKDG	RWIDVPPMRHS-IVVNLGDQLE	VITNGKYKSV	MHRVIA			
LeACO3		AGGIILLFQDDKVSGLQLLKDEQWIDVPPMRHS-IVVNLGDQLE	VITNGKYKSV	MHRVIA				
LeACO4		AGGIILLFQDDKVSGLQLLKDGNWIDVPPMKHS-IVINLGDQLE	VITNGRYKSIE	HRVIA				
LeACO5	178	AGGIILLQDEQVPGLEFFKDGHW	NIIPPSKNNRLFVNIGDQIE	IL	TNGMYKSIR	HRVMA		
		*:~::~	*:~::~	*:~::~	*:~::~	*:~::~	*:~::~	
LeACO1		QTDGTRMS	SLASFYNPGSDAVIYPAKTLVEKEAEES-TQVYP-KFVFDDYMKLYAGLKFQA					
LeACO2		QKDGT	RMS	SLASFYNPGNDALIYPAPALVDKEAEHNKQVYP-KFMFDDYMKLYANLKFQA				
LeACO3		QTDGTRMS	SLASFYNPGNDAVIYPAPSLIE----	ES-KQVYP-KFVFDDYMKLYAGLKFQ				
LeACO4		QQDGT	RMS	IASFYNPGSDAVIFPAPELIEKT-EEDIKLYP-KFVFEDYMKLYAGLKFQA				
LeACO5	238	EKDGNRLS	IATFYNPAGEAII	ISPA-S-----KLLYPCHLRFDQYLNLYSKTKFAE				
		*:~::~	*:~::~	*:~::~	*:~::~	*:~::~	*:~::~	

LeACO1		KEPRFEAMKAMES-----DPIASA
LeACO2		KEPRFEAMKAMES-----DPIAIA
LeACO3		KEPRFEAMKAMEANVELVDQIASA
LeACO4		KEPRFEAMKAVETTVN-LGPIETV
LeACO5	287	KGPRFESAKRLAN-----GH-----
		* ****: * : .

Abb. 23: Aminosäuresequenz-Alignment der fünf ACC Oxidasen aus Tomate. Identische (*) und ähnliche (: oder .) Aminosäuren sind gekennzeichnet. Der Sequenzbereich, der im Hefe Two Hybrid Screen mit ABZ1 interagiert (Unterstreichung), der putative Leucin-Zipper (Fettdruck, L und I rot) und Aminosäuren, die in allen Mitgliedern der Fe(II) Ascorbat Familie der Dioxygenasen konserviert sind (Unterlegung), sind markiert.

4. Diskussion

4.1 Effizienz der SSH-Methode

Durch die Methode der Suppression Subtractive Hybridization (SSH) wurden cDNA Fragmente solcher Gene aus Tomate isoliert, deren Expression Anaerobiose-spezifisch induziert wird.

Von 238 untersuchten Klonen, die Fragmente der Forward Subtraktion enthielten, konnten 41 Fragmente unterschiedlicher Gene isoliert werden, die putativ unter Anaerobiose hochreguliert werden (Kapitel 3.1). Das entspricht einer Ausbeute an anaerob induzierten Zielgenen von ca. 17%. Dies ist z.B. mit dem Ergebnis einer SSH vergleichbar, bei der mit einer Ausbeute von ca. 14% transkriptionell induzierte Gene der Wurzel-Primordien von *Sesbania rostrata* nach Überflutung identifiziert wurden (Caturla *et al.*, 2002). Die differentielle Genexpression in Arabidopsis-Wurzeln, die geringen Sauerstoffkonzentrationen ausgesetzt wurden, wurde mit Hilfe der Microarray Technologie analysiert. 210 nicht redundante Gene der 3500 untersuchten Klone weisen ein differentielles Expressionsprofil auf. 157 dieser differentiell exprimierten Gene sind transkriptionell hochreguliert, was einer 4,5%igen Ausbeute an Zielgenen entspricht (Klok *et al.*, 2002). Damit zeigt die durchgeführte SSH des Tomaten Genoms, im Vergleich zur angeführten Microarray Analyse, eine ca. 4-fach höhere Effizienz.

Die anaerob spezifische Expression von 8 der 41 isolierten SSH Fragmente, deren transkriptionelle Induktion durch eine Northern Blot Analyse verifiziert worden war, konnte bestätigt werden (Kapitel 3.1.1, Abb. 3). In der oben erwähnten Arbeit von Caturla *et al.* (2002) wurde von 26 putativ Überflutungs-induzierten cDNA Fragmenten lediglich eines als falsch-positiv identifiziert. Für hoch-komplexe cDNA Proben, z.B. aus Vertebraten-Gehirn, traten nach SSH jedoch starke Redundanzen der Zielklone in subtrahierten cDNA Banken auf (Rebrikov *et al.*, 2000). Aus diesen Beobachtungen resultiert, dass die Methode der SSH für pflanzliche Proben, wie z.B. das im Vergleich zum Maus Genom relativ gering komplexe Genom der Tomate, praktikabel ist.

4.2 Gegenüberstellung anaerob induzierter Gene aus Tomate und Arabidopsis

Aufgrund von Homologievergleichen konnten 25 der isolierten, forward subtrahierten SSH Fragmente putative Funktionen zugeordnet werden (Tab. 6). Klok *et al.* (2002) haben unter Verwendung der DNA Microarray Technologie unter 3500 cDNA Klonen aus Arabidopsis Wurzelkulturen Gene identifiziert, die unter geringen Sauerstoff

Konzentrationen (5% O₂ und 95% N₂) induziert werden. Durch Vergleich der möglichen Funktionen der anaerob induzierten SSH Fragmente aus Tomate mit den spezifisch unter geringen Sauerstoffbedingungen exprimierten cDNA Klonen aus Arabidopsis ergaben sich sowohl Übereinstimmungen als auch Unterschiede im Expressionsmuster. So wurden in beiden Fällen Gene identifiziert, die potentielle Komponenten der Genexpression und Signaltransduktion codieren. Dabei handelt es sich um bZIP Transkriptionsfaktoren, ein Calmodulin-bindendes Protein, eine Proteinkinase sowie ein Zink RING Finger Protein. Allerdings wurden in Arabidopsis keine bZIP Faktoren identifiziert, die dem aus Tomate isolierten bZIP Protein ABZ1 strukturell ähnlich sind, sondern anderen Subfamilien angehören. Bisher ist lediglich der Mais bZIP Faktor mLIP15 bekannt, der sowohl eine ähnliche Struktur wie der bZIP Transkriptionsfaktor aus Tomate besitzt als auch unter anaeroben Bedingungen eine schwach hochregulierte Transkriptionsrate zeigt (Kusano *et al.*, 1995). Desweiteren wurde in der vorliegenden Arbeit zum ersten Mal ein Transkriptionsfaktor der NAC Familie als Anaerobiose-spezifisch identifiziert (ANA). Das durch SSH isolierte Ethylen-responsive Protein (SSH 35) könnte möglicherweise eine Rolle in der anaeroben Signaltransduktion spielen, da auch ein Ethylen-Rezeptor ETR2, dessen Transkription unter Sauerstoff-armen Bedingungen in Arabidopsis hochreguliert ist, in die Signaltransduktion involviert ist (Klok *et al.*, 2002). Weitere induzierte Gene wurden aufgrund des DNA Microarray Screens der cDNA Bank aus Arabidopsis als Antwort auf Anaerobiose erwartet. Diese codieren Enzyme des Zuckermetabolismus, der Glykolyse bzw. des fermentativen Stoffwechsels und wurden auch durch SSH als anaerob hochregulierte Gene aus der Tomate isoliert (Pyruvat Decarboxylase, SSH 6; Glycerinaldehyd 3-Phosphat Dehydrogenase, SSH 33; Sucrose Synthase, SSH 61 und 122). Desweiteren wurden in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Klok *et al.* (2002) ein Tonoplast-intrinsisches Transportprotein (SSH 143), eine NADH-abhängige Glutaminsynthase der Photorespiration (SSH 11), ein Xyloglucan Inhibitor der fungiziden Pathogenabwehr (SSH 136), ein Seneszenz-assoziiertes Protein (SSH 87) und eine Glucosyltransferase (SSH 224) aus Tomate als Faktoren der pflanzlichen Antwort auf Sauerstoffmangel identifiziert. Im Gegensatz dazu treten einige anaerob induzierte Gene, deren cDNA Fragmente durch SSH isoliert wurden, in der Microarray Analyse der Arabidopsis-Wurzeln nicht auf. Zu diesen zählen die Triosephosphat-Isomerase, die Enolase, die Phosphoenolpyruvat Carboxykinase sowie die Aldo/Keto Reduktase als Enzyme des Kohlenstoffmetabolismus (SSH 59, 62, 73 und 88), Heat-shock Proteine als Komponenten der Proteinsynthese (SSH 7, 55, 101 und 126), ein PHO85-ähnliches Protein mit Funktion im Phosphatmetabolismus und als Transkriptionsregulator (SSH 36) sowie ein Samen-spezifisches Protein (SSH 34). Diese Beobachtung könnte unterschiedliche Ursachen haben. Einerseits wäre es möglich, dass

die entsprechenden cDNA Fragmente nicht auf dem Microarray Chip vorlagen und somit nicht untersucht wurden. Andererseits könnten voneinander abweichende Versuchsbedingungen die Ursache sein. In diesem Fall könnten Unterschiede in der Genexpression aus gewebespezifischen Antworten auf Anaerobiose-Stress resultieren. Während für die Subtraktion auf anaerob-spezifische Gene aus Tomate Gewebe der gesamten Pflanze eingesetzt wurde, einschließlich Früchten, Blättern und Wurzeln, wurde die Analyse der Genexpression in Arabidopsis auf die Wurzeln beschränkt. Außerdem wurden unterschiedliche Randbedingungen des Sauerstoffdefizits gewählt. Die für die SSH eingesetzten Tomatenpflanzen wurden ca. 20 Stunden in einer Atmosphäre von <1% O₂ und 20% CO₂ inkubiert. Im Gegensatz dazu waren die Arabidopsis Wurzelkulturen 30 Minuten, 2, 4 und 20 Stunden einem Sauerstoffmangel von 5% O₂ in Stickstoff ausgesetzt. Daher könnten bestimmte Sauerstoffkonzentrationen, der Gehalt der Atmosphäre an Kohlendioxid bzw. Stickstoff sowie die Dauer der Sauerstoffmangel-Bedingungen Gründe für eine teilweise unterschiedliche Genexpression sein.

4.3 ANA – ein Anaerobiose-spezifischer Aktivator der Transkription?

Ein neuer, durch Anaerobiose induzierter Transkriptionsfaktor aus Tomate, der zur Familie der Proteine mit NAC Domäne gehört, wurde mittels SSH isoliert (ANA, Kapitel 3.1). NAC Proteine können in die drei Subfamilien NAM, OsNAC3 und ATAF eingeteilt werden, die vermutlich unterschiedliche Funktionen haben (Kikuchi *et al.*, 2000). Die ANA Primärstruktur zeigt starke Ähnlichkeiten zu bereits untersuchten NAC Faktoren, insbesondere zu dem durch Pathogen-Befall induzierten Transkriptionsfaktor StNAC aus Kartoffel (Collinge und Boller, 2001). So verfügt ANA über eine hoch konservierte N-terminale NAC Domäne zur DNA-Bindung sowie eine in Hefe nachgewiesene Aktivierungsdomäne im C-Terminus (Abb. 4 und 6). Aufgrund seiner Homologie zu StNAC und den beiden NAC Faktoren aus Arabidopsis, ATAF1 und 2 (Acc.No. CAA52771, CAA52772), gehört ANA wahrscheinlich zur ATAF Subfamilie, die eine wichtige Rolle in der Stressantwort spielt (Collinge und Boller, 2001).

Obwohl der NAC Transkriptionsfaktor ANA kein *in silico* nachweisbares Kernlokalisierungssignal besitzt, kann er unter aeroben Bedingungen teilweise im Nucleus detektiert werden (Kapitel 3.2.2, Abb. 5). Auch CmNACP, ein NAC Protein aus Kürbis, wird, trotz fehlenden Kernlokalisierungssignals, in den Zellkern transportiert (Ruiz-Medrano *et al.*, 1999). Im Gegensatz dazu verfügen andere Transkriptionsfaktoren der NAC Familie über ein Signalpeptid zur Kernlokalisierung, wie z.B. NAC1, das aus Arabidopsis isoliert wurde und in den Auxinstoffwechsel involviert ist (Xie *et al.*, 2000).

Untersuchungen an G-Box Bindungsproteinen aus Petersilie ergaben, dass die Translokation von CPRF4a in den Nucleus, im Anschluß an seine cytosolische Phosphorylierung, Licht-abhängig erfolgt (Wellmer *et al.*, 2001; Harter *et al.*, 1994). In Analogie zu CPRF4a benötigt ANA möglicherweise anaerobe Bedingungen, um vollständig in den Zellkern zu gelangen. Desweiteren könnten post-translationale Modifikationsprozesse notwendig sein, um eine Translokation von ANA in den Nucleus zu gewährleisten. Es wäre denkbar, dass solche Prozesse im heterologen Zwiebelsystem unter aeroben Bedingungen nur unzureichend ablaufen, und ANA deshalb nur teilweise im Nucleus lokalisiert ist.

Wie in Hefe gezeigt wurde, besitzt ANA eine carboxyterminale Aktivierungsdomäne (Kapitel 3.2.3, Abb. 6). Daher könnte auf eine Funktion als Transkriptionsaktivator geschlossen werden, was auf die meisten der bisher beschriebenen NAC Proteine zutrifft (Duval *et al.*, 2002; Ren *et al.*, 2000). Allerdings zeigt ANA, im Vergleich zur GAL4 Positivkontrolle, eine deutlich geringere Transkriptionsaktivierung des Hefereportergens. Diese Beobachtung könnte auf eine generell relativ schwache, transkriptionsaktivierende Wirkung von ANA hindeuten. Andererseits könnte ANA, wie CPRF4a, dessen DNA-Bindungsaktivität durch Licht beeinflusst wird (Wellmer *et al.*, 2001), auf Anaerobiose angewiesen sein, um eine erhöhte Affinität zu seiner Zielsequenz ausbilden zu können und transkriptionsaktivierend zu wirken. Nach transienter Transformation des vollständigen NAC1 Proteins in Zwiebelepidermiszellen wird ebenfalls nur eine sehr geringe Aktivierung beobachtet (Xie *et al.*, 2000), während die Aktivierungsdomäne alleine jedoch eine ähnlich starke transkriptionelle Aktivierung wie die VP16 Domäne bewirkt. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass NAC1 die Expression zweier Auxin-responsiver Gene aktiviert.

Die DNA-Bindungsaktivität und -spezifität von ANA wurde *in vitro* durch Gelshift-Experimente demonstriert (Kapitel 3.2.4, Abb.7). ANA bindet, wie bereits für verschiedene NAC Proteine berichtet wurde, spezifisch an den CaMV 35S Promotor (Duval *et al.*, 2002; Xie *et al.*, 2000). Eine Kompetition des Komplexes aus ANA und Promotorfragment mit RBSS1, einer spezifischen Zielsequenz des bZIP Transkriptionsfaktors ABZ1, war nicht möglich (Daten nicht gezeigt). Auch Xie *et al.* (2000) konnten zwar eine Interaktion von NAC1 mit dem 35S Promotor zeigen, jedoch führte eine Mutation innerhalb der as-1 Sequenz des Promotors, die von vielen Tabak bZIP Faktoren gebunden wird, lediglich zu einer partiellen Beeinträchtigung der Bindung. Die Interaktion des bZIP Faktors ASF-1 mit dem 35S Promotorfragment wurde jedoch aufgrund der mutierten Sequenz aufgehoben. Diese Beobachtungen weisen darauf hin, dass NAC Proteine und bZIP Transkriptionsfaktoren unterschiedliche Bindungsspezifitäten besitzen. Mit der Methode des DNase Footprinting wurde eine

Bindungsstelle für AtNAM (AGGGATG, Duval *et al.*, 2002), einen NAC Faktor aus Arabidopsis, im Bereich von -70 bis -76 bp des 35S Promotors identifiziert. Diese liegt zwar innerhalb des as-1 Elements des CaMV 35S Promotors, aber sie betrifft weder die palindromische noch die unvollständige Core Sequenz des as-1 Elements.

Obwohl ANA also eine Aktivierungsdomäne besitzt und an den CaMV 35S Promotor bindet, konnte im transienten Expressionssystem von Tabak unter aeroben Bedingungen keine erhöhte Expression des CaMV 35S Promotors durch ANA gezeigt werden (Kapitel 3.2.5, Abb. 8).

Die Abbildung 24 fasst die Ergebnisse der funktionellen Analyse von ANA in einem Modell zusammen, das auf den Ergebnissen des transienten Cotransformations-Experiments mit ANA beruht. Möglicherweise kompetiert ANA, trotz unterschiedlicher Bindungsspezifitäten, mit endogenen bZIP Transkriptionsfaktoren aus Tabak um das as-1 Element im CaMV 35S Promotor. Diese Hypothese wird durch die Beobachtung unterstützt, dass ANA nach transienter Coexpression mit dem 35S-GUS Konstrukt nicht, wie erwartet, zu verstärkter GUS-Aktivität, im Vergleich zur GUS-Expression allein, führt. Da ANA eine relativ geringe transaktivierende Wirkung unter Aerobiose ausübt, resultiert, in Folge des Verdrängens stärkerer Tabak bZIP Aktivatoren durch ANA, sogar eine verringerte CaMV 35S Promotoraktivität.

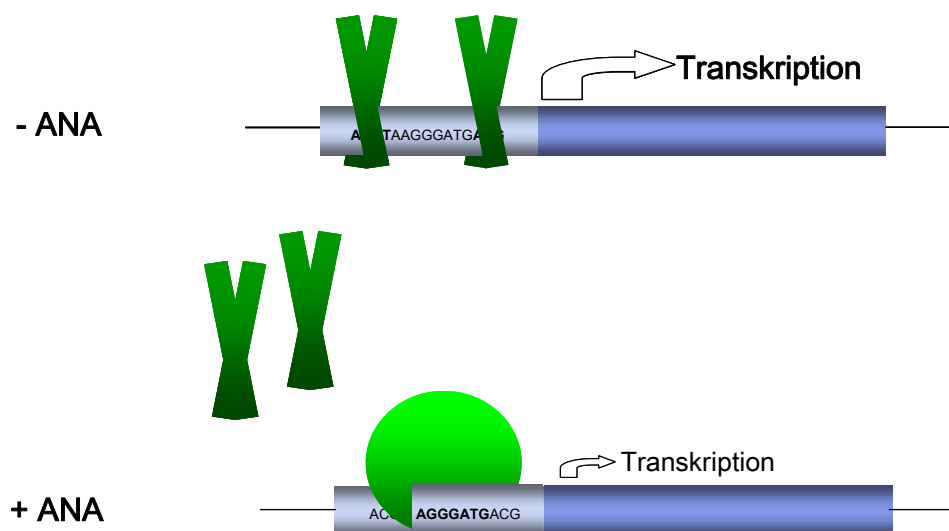


Abb. 24: Modellvorstellung der Regulation des CaMV 35S Promotors (hellblau) nach transienter Coexpression von ANA (grüne Kugel) unter aeroben Bedingungen. Grüne Kreuze: bZIP Transaktivatoren. Fettdruck: Zielsequenzen innerhalb des as-1 Elements der jeweils bindenden Faktoren

4.4 ABZ1 – ein Mitglied der S-Klasse von bZIP Faktoren

ABZ1 konnte zunächst durch *in silico* Analyse seiner Primärstruktur als bZIP Transkriptionsfaktor identifiziert werden und besitzt eine basische sowie eine Leucin-Zipper Domäne, die charakteristisch für bZIP Transkriptionsfaktoren ist (Kapitel 3.3.1, Abb. 9). Aufgrund einer phylogenetischen Analyse der bZIP Domäne von ABZ1 konnten besonders hohe Verwandtschaftsbeziehungen zu ebenfalls relativ kleinen bZIP Faktoren aus Mais, Reis, Tabak, Löwenmäulchen und Petersilie aufgezeigt werden, die aus 133 bis 170 Aminosäuren bestehen (Kapitel 3.3.2, Abb. 10). Von diesen konnte für mLIP15 aus Mais ebenfalls eine Induzierbarkeit durch Anaerobiose nachgewiesen werden, während ABZ1 die höchste Sequenzidentität mit BZI-4, der spezifisch in der Tabakblüte transkribiert wird, zeigt.

bZIP Transkriptionsfaktoren aus Arabidopsis wurden aufgrund struktureller und funktioneller Merkmale in 10 Klassen eingeteilt (Jakoby *et al.*, 2002). Gemäß dieser Gliederung kann ABZ1 der Subfamilie S (small) besonders kleiner bZIP Faktoren zugeordnet werden. Die S-Klasse stellt die Gruppe, der die meisten Transkriptionsfaktoren angehören, dar.

ABZ1 besitzt, wie andere Mitglieder dieser Subfamilie, relativ kurze amino- und carboxyterminale Enden, die keine strukturellen Homologien aufweisen. Außerdem verfügt ABZ1 über einen langen nicht-translatierten 5' Bereich, der ein offenes Leseraster mit hoch konserviertem Aminosäuremotiv beinhaltet (Kapitel 3.3.1, Abb. 9). Für bZIP910 und bZIP911 wurde gezeigt, dass die Anwesenheit ihrer 5' UTRs mit einem solchen uORF zu einer um ca. 60% reduzierten Transkriptmenge des entsprechenden Gens führt (Martinez-Garcia *et al.*, 1998). Der lange 5'Leader von ATB2 aus Arabidopsis ist in die Translationsrepression von ATB2 durch Saccharose involviert (Rook *et al.*, 1998). Möglicherweise wirkt also auch ABZ1 auf Transkript-Ebene regulierend auf seine eigene Expression oder wird post-transkriptionell kontrolliert.

Die postulierte Funktion des basischen Bereichs als DNA-Bindungsdomäne von ABZ1 wurde in Gelshift-Experimenten belegt (Kapitel 3.3.6 und 3.3.7, Abb. 14). Interessanterweise wird die ABZ1 Bindung an seine Zielsequenz durch steigende Mengen eines N-terminal verkürzten ABZ1, dem die DNA-Bindungsdomäne fehlt, sukzessiv aufgehoben. Um eine effektive DNA-Bindung zu ermöglichen, muss ein potentieller ABZ1-Interaktionspartner folglich über eine basische Bindungsdomäne verfügen.

Außerdem verfügt ABZ1 über weitere charakteristische S-Gruppen Merkmale. Dazu gehören die Länge seines Leucin-Zippers (Abb. 9), seine Codierung durch ein einziges

Exon (Daten nicht gezeigt), seine DNA-Bindungsspezifität (Tab. 7 und Abb. 12) sowie seine Induzierbarkeit durch abiotischen Anaerobiose-Stress (Kapitel 3.1.1, Abb. 3).

4.5 DNA-Bindungsspezifität von ABZ1

Durch eine PCR-unterstützte Zufallsselektion auf Zielsequenzen wurde festgestellt, dass ABZ1 sowohl an halbe als auch an vollständige G-Boxen bindet. Dabei ist die Core-Sequenz essentiell. Die flankierenden Positionen, denen aufgrund des IUPAC Mehrdeutigkeitscodes ein bestimmtes Nucleotid zugeordnet werden kann, kommt eine große Bedeutung für die Bindungsspezifität zu (G an Positionen +2 und +3; T an Position -3; Kapitel 3.3.4, Tab. 7). Im Vergleich dazu haben die Positionen -6, -5 und -3, an denen entweder G oder T bevorzugt werden, eine geringere Priorität. Allerdings sind diese wichtiger für die Affinität und Spezifität der DNA-Bindung als die Positionen, an denen jedes beliebige Nucleotid vertreten sein kann (N an Positionen -4, +4, +5 und +6; Kapitel 3.3.4).

Bei dem hier durchgeführten Random Binding Site Selection Assay wurden allerdings keine vollständig zufälligen Oligonucleotide eingesetzt, sondern eine 4 Nucleotide umfassende Coresequenz war vorgegeben. Dennoch wurde unerwarteterweise eine potentielle Bindungsstelle isoliert, deren Coresequenz mutiert ist (Tab. 7A, RBSS10.1). Wie im Gelshift-Experiment gezeigt wurde, bindet ABZ1 allerdings nicht an die putative Zielsequenz RBSS10.1 (Abb. 12). Daher scheint eine Überprüfung der selektierten Zielsequenzen erforderlich zu sein, um zuverlässige Aussagen über die Bindungsspezifität von ABZ1 treffen zu können. Von den selektierten Sequenzen, die im elektrophoretischen Mobilitätsshift-Assay (EMSA) untersucht wurden (Tab. 7A, Fettdruck), entsprechen lediglich RBSS1 und RBSS2.1 vollständig der ermittelten Consensus Sequenz. RBSS1 wird, wie erwartet, spezifisch von ABZ1 gebunden. Die Affinität von ABZ1 zu RBSS2.1 scheint größer zu sein als die zu RBSS1, da keine vollständige Competition mit RBSS1 als spezifischem Kompetitor möglich ist (Abb. 12). Bei allen anderen im EMSA überprüften potentiellen Zielsequenzen, die nicht vollständig der Consensus Sequenz entsprechen, scheint das Nucleotid an Position -5 eine wichtige Rolle zu spielen. Ein C an dieser Position führt offensichtlich zu einer stark reduzierten Bindungsspezifität, auch wenn alle anderen Positionen mit Nucleotiden der Consensus Sequenz belegt sind (RBSS8; vgl. Abb. 12 und Tab. 7). Weichen die gemäß des IUPAC Codes eindeutigen Nucleotide an den Positionen -3 und +3 von der Consensus Sequenz ab, so ist vermutlich das T an Position -5 für die geringe Bindungsspezifität im EMSA verantwortlich (RBSS9; vgl. Abb. 12 und Tab. 7). Denn bei Vergleich von RBSS9 mit

RBSS5 wird festgestellt, dass Position -5 eine höhere Priorität für die DNA-Bindung haben muß als die einzige weitere relevante Position -2.

Die ermittelte Consensus Sequenz erhebt keinen Anspruch auf Vollständigkeit. Die Anzahl der sequenzierten putativen Zielsequenzen ist unter Berücksichtigung der Anzahl der selektierten Nucleotidpositionen zu gering, um ein signifikantes Ergebnis zu erhalten. Außerdem wurde nicht die DNA-Bindung aller selektierten Zielsequenzen im EMSA verifiziert. Dennoch sind deutliche Parallelen zu den Consensus Bindesequenzen der Faktoren bZIP910 und bZIP911 aus *Antirrhinum majus*, die ebenfalls der S-Klasse der bZIP Proteine angehören, festzustellen (Tab. 8). Die Zielsequenzen von bZIP910 und 911 wurden ebenfalls mit Hilfe eines PCR-unterstützten Selektionsassays isoliert. Zusätzlich zur ACGT Core Sequenz (Tab. 8, -1 bis +1) werden sowohl von bZIP910 und 911 als auch von ABZ1 an der Position -3 ein T, an der Position +2 ein G und an den Positionen -2 und +3 entweder ein G oder T präferentiell gebunden. Außerdem beinhalten die selektierten bZIP910 und 911 Sequenzen, wie die verifizierten Fragmente RBSS1 und 6.1, ein asymmetrisches ACGT Element (ACE), das aus einer halben C-Box/G-Box besteht (GACGTG; Martinez-Garcia *et al.*, 1998).

Tab. 8: Consensus Zielsequenzen von ABZ1, bZIP910 und bZIP911. Die Nucleotidpositionen sind mit -6 bis -0 und von +0 bis +6 angegeben. Die Größe der IUPAC Code Buchstaben korreliert mit ihrer Bedeutung für die DNA-Bindungsspezifität der bZIP Faktoren.

	-6	-5	-4	-3	-2	-1	-0	+0	+1	+2	+3	+4	+5	+6
ABZ1	K	K	N	T	K	A	C	G	T	G	G	N	N	N
bZIP910		G	R	T	G	A	C	G	T	G	G	C	M	
bZIP911		R	R	T	G	A	C	G	T	G	K	M	C	

ABZ1 bindet *in vitro* spezifisch an den CaMV 35S Promotor, der drei putative ABZ1 Zielsequenzen mit palindromischer ACGT Coresequenz beinhaltet. Es werden zwei Protein-DNA Komplexe gebildet, die auf ihrer unterschiedlichen Anzahl der gebundenen ABZ1 Proteine beruht (Kapitel 3.3.5, Abb. 13). Durch Vergleich mit der für ABZ1 erstellten Consensus Zielsequenz könnte der Bereich um die zweite Core Sequenz (vgl. Abb. 13A) die stärkste und spezifischste Bindung des bZIP Transkriptionsfaktors und somit den schneller wandernden Komplex K2 hervorrufen. Diese Interaktion scheint spezifischer zu sein als die Bindung von ABZ1 an den spezifischen Kompetitor RBSS1 oder die anderen potentiellen Bindestellen innerhalb des 35S Promotors. Der Gegenstrang stellt nämlich, im Gegensatz zu den beiden anderen putativen Bindungsstellen, eine halbe C-Box/G-Box dar. Außerdem zeigt diese putative

Zielsequenz lediglich an Position -3 eine Abweichung von der Consensus Sequenz. Offensichtlich bindet ABZ1 zusätzlich an eine oder beide weiteren Promotorregionen, die die palindromische Coresequenz enthalten. Dabei entsteht ein weiterer, langsamer wandernder Komplex (K1) mit ABZ1, das simultan an verschiedene DNA-Sequenzen bindet. Die, im Vergleich zu K2, zusätzliche Komplexbildung ist allerdings weniger spezifisch (Abb. 13B).

Die Fähigkeit von Transkriptionsfaktoren multiple DNA-Interaktionen einzugehen sowie die Tatsache, dass eine Bindungsstelle Zielsequenz für unterschiedliche *trans*-Faktoren sein kann, hängt offensichtlich von verschiedenen Faktoren ab. So nehmen z.B. Entwicklungsstadien, äußere Bedingungen, die Verfügbarkeit anderer interagierender Proteine, die relative Affinität von Transkriptionsfaktoren zu ACE's sowie die relative Auftrittshäufigkeit bestimmter Faktoren Einfluß auf die tatsächliche Bindung eines Transkriptionsfaktors an DNA-Sequenzen (Martinez-Garcia *et al.*, 1998).

4.6 Aspekte der Homo- und Heterodimerisierung von ABZ1

In der vorliegenden Arbeit konnte der Leucin-Zipper von ABZ1 durch EMSA mit einer N- bzw. C-terminalen ABZ1-Mutante experimentell als Dimerisierungsdomäne bestätigt und auf die Aminosäuren 47 bis 100 als Interaktionsdomäne eingeschränkt werden (Kapitel 3.3.7, Abb. 14; Kapitel 3.3.8, Abb.15). ABZ1 kann also *in vitro* Homodimere bilden. Außerdem wurde im Yeast Two Hybrid Screen kein anderer bZIP Transkriptionsfaktor selektiert. Dieses Ergebnis könnte darin begründet sein, dass die meisten bZIP Faktoren unter anaeroben Bedingungen, unter denen die mRNA zur Erstellung der Expressionsbank isoliert wurde, selbst transkriptionell reprimiert sind. Diese Hypothese wird indirekt durch die Beobachtung unterstützt, dass die Transaktivität des CaMV 35S Promotors unter anaeroben Bedingungen in Tabak deutlich stärker reduziert wird als unter Normoxia in Gegenwart von ABZ1 (vgl. Abb. 17A mit Abb. 16). Zusammenfassend kann also festgestellt werden, dass ABZ1 möglicherweise *in planta* ebenfalls homodimerisiert. Allerdings gibt es auch Anhaltspunkte, die für eine Heterodimerisierung von ABZ1 sprechen. Z.B. bildet BZI-4, der nächste Verwandte von ABZ1, mit BZI-1 Heterodimere (Strathmann *et al.*, 2001). Desweiteren wurde eine Interaktion zwischen bZIP911 und bZIP910 nachgewiesen, die dem ABZ1 strukturell relativ nah verwandt sind und ähnliche DNA-Bindungsspezifitäten wie ABZ1 besitzen (Martinez-Garcia *et al.*, 1998).

4.7 ABZ1 - ein anaerob spezifischer Repressor der Transkription?

Nachdem *in vitro* eine spezifische Bindungsaktivität des bZIP Transkriptionsfaktors ABZ1 an den CaMV 35S Promotor nachgewiesen werden konnte (Kapitel 3.3.6, Abb. 13B), wurde die Aktivität des 35S Promotors in Abhängigkeit von ABZ1 in transient transformiertem Tabak untersucht. Diese Cotransformationsexperimente zeigten, dass die Aktivität des CaMV 35S Promotors nach Coexpression von ABZ1 unter aeroben Bedingungen schwächer ist (Kapitel 3.3.9; Abb. 16). Da ABZ1 keine Prolin-reiche Aktivierungsdomäne besitzt, wird angenommen, dass ABZ1 reprimierend auf den 35S Promotor wirkt. Außerdem führt Anaerobiose sowohl in Tabak- als auch in Tomatenblättern zu einer, im Vergleich zu aeroben Bedingungen, reduzierten Aktivität des CaMV 35S Promotors (Kapitel 3.3.10; Abb.17). Folglich könnte ABZ1, dessen Expression unter anaeroben Bedingungen induziert wird, für die reduzierte Aktivität des CaMV 35S Promotors bei Anaerobiose verantwortlich sein.

In transgenen Tomatenpflanzen, die stabil mit einem CaMV 35S Promotor-Reportergen Konstrukt transformiert worden waren, spiegeln die Transkriptmengen des Reportergens eine heterogene Expressionsregulation unter aeroben bzw. anaeroben Bedingungen wieder (Kapitel 3.3.11, Abb.18). Diese Beobachtung könnte aus der Transkriptstabilität des GUS-Gens, auch unter anaeroben Bedingungen, resultieren. Weiterhin könnten Positionseffekte in transgenen Pflanzen für die unterschiedliche Expression der einzelnen Linien verantwortlich sein.

Die Modelle A-C in Abbildung 25 fassen die in der vorliegenden Arbeit erzielten Versuchsergebnisse zusammen und stellen mögliche Funktionsweisen von ABZ1 im Hinblick auf seine Regulation des CaMV 35S Promotors im transienten und im transgenen System gegenüber. Die Diskrepanz zwischen den Ergebnissen, die im stabil und transient transformierten System erzielt wurden, könnten auf den für ABZ1 unterschiedlichen Bindungsvoraussetzungen beruhen. In transgenen Pflanzen sind unter aeroben Bedingungen bereits Transkriptionsfaktoren an den CaMV 35S Promotor gebunden (Modell C, +O₂). Da die ABZ1-Expression erst durch Anaerobiose induziert wird, muß ABZ1 dann vermutlich mit anderen *trans*-Faktoren, u.a. auch mit ANA, um die entsprechenden *cis*-regulatorischen Elemente kompetieren (Modell C, -O₂). Das führt wahrscheinlich zum beobachteten heterogenen Effekt (Kapitel 3.3.11, Abb. 18). Weil sowohl anaerobe Transkriptionsrepressoren als auch –aktivatoren binden können, ist eine verstärkte, unveränderte oder verringerte Expression des CaMV35S Promotors die Folge. In transient transformiertem Blattmaterial kommt es hingegen zu einer *de novo* Bindung von Transkriptionsfaktoren an den 35S Promotor. Dadurch kann die Bindung von ABZ1 an den 35S Promotor, im Vergleich zum transgenen System, vermutlich

leichter erfolgen (Modell B, $-O_2$). Nach transienter Coexpression von ABZ1 unter aeroben Bedingungen kompetiert ABZ1 vermutlich mit endogenen Transfaktoren aus Tabak um die Zielsequenzen innerhalb des CaMV 35S Promotors. Daraus resultiert zwar eine verringerte Expression des 35S Promotors, jedoch keine vollständige Inhibierung (Modell A, vgl. $-ABZ1$ mit $+ABZ1$).

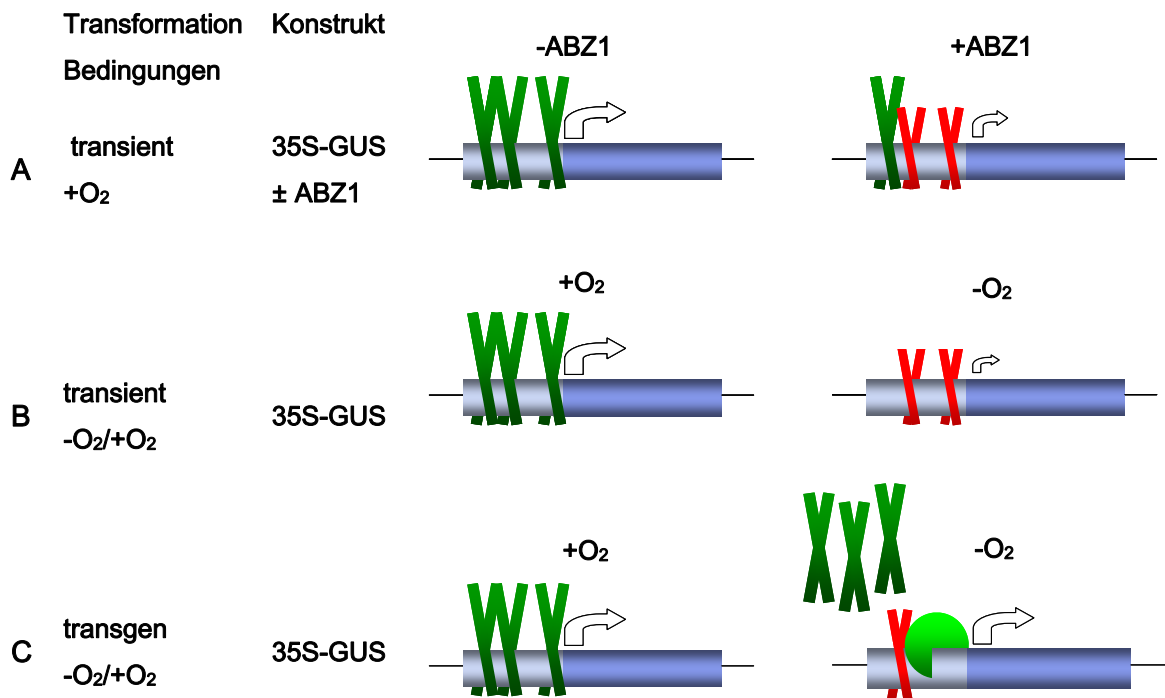


Abb. 25: Gegenüberstellungen der Regulation des CaMV 35S Promotors (hellblau) durch aktivierende (grün) und reprimierende (rot) Transfaktoren unter diversen Versuchsbedingungen. Die Pfeilgröße korreliert mit der Expressionsstärke des GUS Gens (blau). Kreuze: bZIP Faktoren; rotes Kreuz: ABZ1; grüne Kugel: ANA

Ein weiteres Beispiel für eukaryotische Transkriptionsrepressoren stellt das aus der Maus isolierte Jun Dimerisierungsprotein 2 (JDP2) dar. Es ist mit 163 Aminosäuren ein ebenfalls relativ kleines bZIP Protein. JDP2 bindet entweder als Homo- oder als Heterodimer mit dem Transkriptionsaktivator ATF-2 an das cAMP-Response Element (CRE). Dadurch reprimiert es die CRE-abhängige und durch ATF-2 vermittelte Transkription (Jin *et al.*, 2001). Weiterhin interagiert JDP2 auch mit einem Histon Deacetylase Komplex (HDAC) und inhibiert nach Bindung an ein Differentiation Response Element innerhalb des Promotors des c-jun Gens dessen Transkription, die sonst durch ATF-2 aktiviert wird. Dieses Beispiel macht deutlich, dass auch Interaktionsreaktionen bekannt sind, bei denen ein Transkriptionsfaktor nicht mit anderen Transkriptionsfaktoren, sondern mit Enzym Komplexen interagiert. Kommt es zur

kompetitiven Bindung solcher Proteinkomplexe an Promotorbereiche, kann dadurch die Transkription der betroffenen Gene reprimiert werden. So sind einige Beispiele transkriptioneller Repressoren in Eukaryoten bekannt, jedoch wäre ABZ1 der erste pflanzliche Repressor, der durch Anaerobiose induziert wird.

Die Bedeutung zahlreicher pflanzlicher bZIP Transkriptionsfaktoren, die in die anaerobe Genexpression involviert sind, ist weitgehend unerforscht. Das G-Box bindende Protein (GBF1) aus Mais ist zwar, wie ABZ1, anaerob induziert, besitzt aber eine N-terminale Aktivierungsdomäne (de Vetten und Ferl, 1995). Im Gegensatz dazu weist ein anderer anaerob induzierter bZIP Faktor aus Mais, mLIP15, strukturelle Ähnlichkeiten zu ABZ1 auf. Er ist, ähnlich wie ABZ1, nur 135 Aminosäuren lang und besitzt keine Prolin-reiche Aktivierungsdomäne (Kusano *et al.*, 1995). Obwohl beide bZIP Faktoren aus Mais an den Mais ADH Promotor binden, zeigen sie ein zeitlich unterschiedliches Expressionsprofil unter anaeroben Bedingungen. Folglich wäre es denkbar, dass GBF1 relativ schnell nach Auftreten geringer O₂-Konzentrationen als Aktivator der ADH Expression wirkt, während mLIP15, aufgrund seiner späteren Expression, bei andauerndem O₂-Mangel reprimierend auf die anaerobe Genexpression wirkt. Zusammen mit der Beobachtung, dass ABZ1 die Genexpression herunterreguliert, könnte angenommen werden, dass kleine bZIP Faktoren ohne Prolin-reiche Aktivierungsdomäne in die anaerob herunterregulierte Genexpression involviert sind.

4.8 ABZ1-Interaktionspartner

Zur weiteren funktionellen Charakterisierung von ABZ1 wurden durch einen Yeast Two Hybrid Screen einer anaeroben Expressionsbank potentielle Interaktionspartner des bZIP Transkriptionsfaktors isoliert und identifiziert. Alle mit ABZ1 interagierenden Peptide besitzen einen putativen Leucin-Zipper, der eine mögliche Protein-Protein Bindung mit dem ABZ1 bZIP Transkriptionsfaktor vermitteln könnte (Kapitel 3.3.12, Abb. 20).

Von 1x10⁵ gescreenten Klonen der Prey Expressionsbank wurden lediglich für einen potentiellen Interaktionspartner, nämlich eine ACC Oxidase, zwei unabhängige Klone isoliert. Daher wäre es möglich, dass die anaerobe Expressionsbank nicht alle Gene repäsentiert.

Das interagierende Peptid, das homolog zu einer Untereinheit des Exocytosekomplexes ist, und 90 Aminosäuren umfasst, stellt offensichtlich nur ein kurzes Peptid eines deutlich größeren Proteins von 637 Aminosäuren aus *Arabidopsis thaliana* dar (AT5G50380.1). Die Exo70 Domäne dieses Proteins aus *Arabidopsis* beinhaltet 550 Aminosäuren (Pfam domain PF03081). Folglich handelt es sich vermutlich eher um ein zufällig interagierendes Peptid als um eine Domäne eines tatsächlichen Interaktionspartners.

Funktionell ist das Exo70 Protein in die Sekretion, den Vesikel- sowie den intrazellulären Transport involviert.

Mit einem Transducin homologen Peptid scheint ebenfalls nur ein kurzer Sequenzabschnitt von 202 Aminosäuren eines deutlich größeren Proteins der WD40 Repeat Familie, das 1344 Aminosäuren besitzt, selektiert worden zu sein (NP_187938). Die Homologie des interagierenden Peptids aus Tomate erstreckt sich nicht auf die WD40 Repeat Domäne, über die Protein-Protein Interaktionen erfolgen. Aufgrund der geringen Größe des klonierten Prey-Fragmentes und der nicht enthaltenen bekannten Interaktionsdomäne stellt das selektierte Peptid möglicherweise ebenfalls nur ein Zufallspeptid dar, das mit ABZ1 interagiert. Transducin ist funktionell an der Signaltransduktion beteiligt.

Ein drittes mit ABZ1 interagierendes Peptid umfasst 148 Aminosäuren. Dieses klonierte Fragment ist homolog zu einer 179 Aminosäuren langen, putativen Untereinheit der ATP-Synthase aus *Glycine max* (CAA52349; Smith *et al.*, 1994). Aufgrund der ähnlichen Größen von selektiertem Peptid und Homolog besteht eine relativ große Wahrscheinlichkeit, dass ABZ1 tatsächlich mit dieser ATP-Synthase Untereinheit aus Tomate interagiert. Die ATP-Synthase ist in Mitochondrien- und Thylakoidmembranen lokalisiert und ist an der Photophosphorylierung beteiligt. Sie katalysiert sowohl die ATP-Synthese als auch die reversible Hydrolyse von ATP zu ADP und einem Phosphatrest.

Zwei weitere potentielle ABZ1 Interaktionspartner, das IDS4-like Protein (AIL) sowie die ACC Oxidase (LeACO5). Ihre funktionellen Bedeutungen werden in den folgenden Kapiteln eingehender diskutiert. AIL könnte ein realer Interaktionspartner des ABZ1 sein, da das interagierende Peptid 170 Aminosäuren umfasst und somit einem großen Anteil des vollständigen AIL aus Tomate mit 266 Aminosäuren entspricht. Aufgrund seiner SPX-Domäne und der daraus resultierenden Beteiligung an Signaltransduktions-Vorgängen könnte das IDS4-like Protein interessant sein. Die beiden mit ABZ1 interagierenden Peptide, die Homologien zur 312 Aminosäuren langen ACC Oxidase LE-ACO4 (BAA34924; Nakatsuka *et al.*, 1998) aufweisen, stellen mit 128 bzw. 161 Aminosäuren ebenfalls einen relativ hohen Anteil des Gesamtproteins LeACO5 mit 301 Aminosäuren dar. Außerdem wurden zwei unabhängige Klone dieser ACC Oxidase im Hefe Two Hybrid Screen isoliert. Aus diesen Gründen liegt die Vermutung nahe, dass ABZ1 tatsächlich mit dieser LeACO5 interagiert. Andererseits liegt ihr Leucin-Zipper innerhalb des katalytischen Zentrums, so dass eine reale Interaktion mit ABZ1 *in planta* eher unwahrscheinlich ist. Schließlich stellt sie ein neues Mitglied der Oxidoreduktase-Familie dar, die für die Ethylensynthese von Bedeutung ist. Somit steht sie indirekt mit der anaeroben Signaltransduktion in Zusammenhang.

Obwohl ABZ1 als Transkriptionsfaktor funktionell im Zellkern aktiv ist, sind seine potentiellen Interaktionspartner, mit Ausnahme des AIL, vermutlich nicht im Nucleus lokalisiert. Diese Annahme geht aus ihrer putativen Funktion hervor. Demnach müsste eine Interaktion mit diesen potentiellen Partnern im Cytoplasma erfolgen, bevor ABZ1 in den Zellkern transportiert wird. In einem ähnlichen Vorgang, dessen funktionelle Bedeutung allerdings unklar ist, wird die intrazelluläre Lokalisierung des bZIP Faktors RSG im Cytoplasma sowie ihr Kerntransport durch ein 14-3-3 Protein reguliert (Igarashi *et al.*, 2001). Das zweigeteilte Kernlokalisierungssignal von ABZ1, dessen Lage innerhalb der basischen Domäne experimentell bestimmt werden konnte, vermittelt jedoch den vollständigen Transport des bZIP Transkriptionsfaktors unter aeroben Bedingungen in den Nucleus (Kapitel 3.3.3, Abb. 11). Die Kernlokalisierung von ABZ1 bietet also keinen direkten Hinweis auf eine cytoplasmatische Retention. Andererseits wird eine ABZ1 Mutante, die lediglich über den 44 Aminosäuren langen N-Terminus, einschließlich des NLS, verfügt, sowohl im Zellkern als auch im Cytoplasma detektiert (Abb. 11). Diese Beobachtung könnte daraus resultieren, dass z.B. entsprechende Phosphorylierungsstellen des C-Terminus fehlen, wodurch keine ausreichende Phosphorylierung erfolgen kann, und kein vollständiger Transport in den Zellkern möglich ist. Demnach wäre eine cytoplasmatische Interaktion mit Proteinen, die der posttranslationalen Modifikation von ABZ1 dienen, denkbar.

Überraschenderweise scheint keiner der potentiellen ABZ1 Interaktionspartner direkt in die Transkription von Zielgenen involviert zu sein. BZI-1, ein bZIP Transkriptionsfaktor aus Tabak, interagiert außer mit anderen Faktoren der bZIP Familie auch spezifisch mit dem cytosolischen Ankyrin-Repeat Protein ANK1 (Kuhlmann *et al.*, 2003). Diese Interaktion wird durch die hoch konservierte, α -helikale D1 Domäne von BZI-1 und die vier C-terminalen Ankyrin-Repeats von ANK1 vermittelt. ANK1 besitzt weder eine DNA-Bindungsdomäne noch wirkt es als Co-Aktivator der BZI-1 vermittelten Transkription. *In vitro* inhibiert ANK1 jedoch die DNA-Bindung von BZI-1. Daher wird angenommen, dass ANK1 die Funktion von BZI-1 im Auxin-Stoffwechsel sowie in der Pathogenabwehr reguliert (Kuhlmann *et al.*, 2003). Ähnlich wie ANK1 könnten die in dieser Arbeit im Hefe Two Hybrid Screen identifizierten Proteine ebenfalls die Funktion von ABZ1 in der anaeroben Signaltransduktion beeinflussen und regulierend auf dessen Aktivität einwirken.

4.8.1 AIL - ein potentiell durch Eisenmangel induziertes Protein und seine Bedeutung für Anaerobiose

Eisen ist ein essentielles Element für Pflanzen. Es wirkt als Cofaktor für viele Enzyme, wie z.B. für die ACC Oxidase, und katalysiert den Elektronentransfer in Mitochondrien und Chloroplasten. Eisen liegt häufig im Boden vor. Unter Sauerstoffmangel sinkt das Redoxpotential des Bodens und es kommt zur Akkumulation von reduzierten u.a. anorganischen Substanzen, wie z.B. Fe^{2+} . Die Aufnahme solcher löslichen Eisenionen kann zu einem phytotoxischen Eisen-Level in der Pflanze führen (Drew, 1997). Im Gegensatz dazu bildet Eisen unter aeroben Bedingungen oft schwer lösliche Oxid- oder Hydroxid-Präzipitate (Fox und Guerinot, 1998). Dann ist seine Verfügbarkeit für Pflanzen limitiert. Deshalb besitzen Pflanzen Mechanismen, die es ihnen erlauben, Eisen aus seiner unlöslichen in seine lösliche Form zu überführen, um es aufzunehmen. Jedoch müssen diese Mechanismen sehr exakt reguliert werden, damit kein oxidativer Schaden durch übermäßige Eisenaufnahme für die Pflanzen entsteht.

Ids (Iron deficiency specific) Gene werden spezifisch bei Eisenmangel exprimiert. Zuerst wurden solche Gene in *Hordeum vulgare* als höheren Pflanzen entdeckt. IDS1, ein putativ Metall-bindendes Protein (Okumura *et al.*, 1991), sowie IDS2 (Okumura *et al.*, 1994) und IDS3 (Nakanishi *et al.*, 1993), 2-Oxoglutarat abhängige Dioxygenasen, wurden aus der Gerste isoliert. Ihre Expression wird spezifisch bei Eisenmangelbedingungen in den Wurzeln induziert. Es wird angenommen, dass sie funktionell in die Synthese und Sekretion von Eisen-Chelaten, die als Phytosiderophore (z.B. MA) wirken, sowie in die Absorption von Fe^{3+} -MA involviert sind. Da es sich bei AIL jedoch um ein IDS4-like Protein handelt, das keine konservierte Oxidoreduktase Domäne besitzt, unterscheidet es sich wahrscheinlich funktionell von den bekannten IDS Proteinen.

In Tomatenwurzeln mit Eisen-Defizit wurde gezeigt, dass die Expression der Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase erhöht ist. Ob dieser Anstieg aus einer verringerten oxidativen Respiration resultiert oder durch Ausschleusen von Kohlenstoff aus der Glykolyse als Folge der gesteigerten Phosphoenolpyruvat Carboxylase Aktivität zustande kommt, ist unklar (Herbik *et al.*, 1996). Die Analyse der Genexpression als Antwort auf Eisen-Mangel in Arabidopsis führte zu einer gesteigerten Expression von Genen der Respiration. In Wurzeln wurden allerdings auch Gene der anaeroben Respiration induziert, während in Sprossen u.a. eine Induktion verschiedener Gene der Glucogenese beobachtet wurden (Thimm *et al.*, 2001). Da Eisen u.a. für Komponenten des Redoxsystems der oxidativen Phosphorylierung essentiell ist, induzieren Anaerobiose und Eisendefizit offensichtlich teilweise dieselben Stoffwechselenzyme als

Stress-Antwort. Durch eine Northern Blot Analyse wurde gezeigt, dass AIL anaerob-spezifisch transkribiert wird (Kapitel 3.3.13, Abb. 21). Folglich konnte auch in der vorliegenden Arbeit ein molekularer Zusammenhang zwischen Anaerobiose-Stress und fehlenden Eisens aufgezeigt werden.

AIL besitzt, im Vergleich zu seinen Arabidopsis Homologen, den längsten Leucin-Zipper (Abb. 22). Eine spekulative Funktionsweise eines potentiellen ABZ1/AIL Heterodimers könnte auf der Fähigkeit der SPX-Domäne von AIL beruhen, Interaktionen mit unterschiedlichen Partnern eingehen zu können. Unter Berücksichtigung einer potentiellen Funktion des AIL im Eisenmetabolismus, wäre folgendes Modell möglich. Die unter anaeroben Bedingungen in hohen Konzentrationen aufgenommenen Fe^{2+} Ionen könnten direkt oder indirekt als Signalmoleküle vom Rezeptor gebunden werden. Die dadurch aktivierte α -Untereinheit des G-Proteins könnte dann mit AIL als Effektor interagieren und dessen Aktivierung oder Inaktivierung bewirken. Nachfolgend könnte AIL so auf die Signaltransduktion einwirken, dass eine Aufnahme toxischer Mengen an Eisenionen unterbunden wird. Kommt es jedoch zu einer Interaktion des putativen Leucin-Zippers von AIL mit ABZ1, so würde die Bindung von AIL an $G\alpha$ über seine SPX-Domäne sterisch behindert werden. Die nachgeschaltete G-Protein vermittelte Aktivierung oder Inaktivierung des IDS4-like Proteins würde unterdrückt werden, und die α -Untereinheit hätte nun die Möglichkeit mit einem anderen Effektor, der z.B. die Eisenaufnahme fördert, entsprechend auf die Signaltransduktion einzuwirken. Folglich würde durch die regulatorische Interaktion mit ABZ1 die Aufnahme geringer Mengen an Eisenionen, die als Cofaktoren für Enzyme nötig sind, aufrechterhalten werden. In diesem Fall würde IDS4-like sowohl als Ionen-Sensor als auch als Komponente der daraus resultierenden Signaltransduktion dienen. Eine Feinregulation der Eisenaufnahme unter Anaerobiose wäre die Folge.

Zwar verfügt AIL über ein zweigeteiltes Kernlokalisierungssignal, das für den Nucleus als eigentlichen Wirkungsort spricht. Jedoch scheint eine Funktion zusammen mit ABZ1 als Transkriptionsfaktor eher unwahrscheinlich, da AIL keine DNA-Bindungsdomäne besitzt. Diese wäre jedoch die Voraussetzung für eine Bindung des ABZ1/AIL Heterodimers an DNA (Kapitel 3.3.7, Abb. 14).

4.8.2 AIL als Komponente der anaeroben Signaltransduktion

AIL besitzt, wie seine vier höchsten Homologen aus Arabidopsis, eine N-terminale SPX-Domäne (Abb. 22; Locus AT5G20150, AT5G15330, AT2G45130, AT2G26660). Die Expression des IDS4-like Proteins, das die höchste Sequenzidentität mit AIL aufweist (locus AT5G20150), wird durch gesteigerte CO_2 -Konzentrationen induziert (TAIR

Datenbank, Kapitel 2.18). Da das Pflanzenmaterial, aus dem die RNA für die anaerobe cDNA- und Hefeexpressionbank synthetisiert worden war, ebenfalls unter anaeroben Bedingungen mit erhöhtem CO₂-Gehalt inkubiert worden war (Anaerobcult), scheint die Expression von AIL und seinem Arabidopsis Homolog ähnlich reguliert zu sein. Die Bezeichnung der SPX-Domäne setzt sich aus den Proteinen SYG1, PHO81 und XPR1 zusammen. Der N-Terminus des Hefeproteins SYG1 bindet direkt an die β -Untereinheit von G-Proteinen und inhibiert die Signaltransduktion eines Paarungspheromons (Spain *et al.*, 1995). Daher wird angenommen, dass alle Proteine dieser Familie in die G-Protein assoziierte Signaltransduktion involviert sind. Wenn AIL, wie SYG1, über seine SPX-Domäne an die β -Untereinheit von G-Proteinen binden würde, könnte es solche Signaltransduktionswege, die unter Anaerobiose nicht benötigt werden, inhibieren. Andere Proteine, die an der Regulation des Phosphattransports beteiligt sind, besitzen ebenfalls eine SPX-Domäne. Dazu zählen PHO81 aus Hefe (Lee *et al.*, 2000) und das menschliche XPR1 Protein, die als putative Phosphatsensoren Komponenten der G-Protein assoziierten Signaltransduktion darstellen könnten (Battini *et al.*, 1999). PHO81 bildet nämlich stabile Komplexe mit Cyclin und einer Cyclin-abhängigen Kinase und inhibiert die Kinase in Zellen, in denen Phosphatmangel auftritt (Huang *et al.*, 2001). In Analogie könnte das anaerob induzierte AIL den Zellzyklus inhibieren und dadurch für den Zelltod anaerober Wurzelspitzen (Subbaiah *et al.*, 2000) sowie die damit verbundene Wachstumshemmung verantwortlich sein.

4.8.3 Eine neue anaerob spezifische ACC Oxidase

Die anaerob induzierte und mit ABZ1 interagierende ACC Oxidase aus *Lycopersicon esculentum* (LeACO5) ist ein Homolog einer ACC Oxidase aus *Solanum tuberosum* (AAM29183, Zanetti *et al.*, 2002). Die ACC Oxidase aus Kartoffel umfasst 312 Aminosäuren und ist, wie LeACO5, Stress-induziert. Ihre Expression wird infolge von Pathogeninfektion hochreguliert. Nach Homologievergleich und Sequenzanalyse konnte LeACO5 aufgrund ihrer konservierten Domäne der Fe(II) Ascorbat Oxidoreduktase Familie als eine neue, fünfte ACC Oxidase aus Tomate bestätigt werden (Kapitel 3.3.15, Abb. 23).

ACC Oxydasen spielen eine wichtige Rolle im Ethylen-Stoffwechsel. Ethylen ist als pflanzliches Hormon für Wachstum, Entwicklung und für die Stressantwort von Bedeutung (Halliday *et al.*, 2003). Insbesondere bei der Fruchtreifung spielt Ethylen eine große Rolle. Häufig führt Ethylen zur Aktivierung von Genen (Sauter *et al.*, 2002). Infolge hoher CO₂- und niedriger O₂-Konzentration wird die ACC Oxidase Aktivität in Tomatenfrüchten stimuliert, wodurch der Ethylen-Gehalt ansteigt (Terai *et al.*, 1998).

Dem entsprechend wurde in der gewebespezifischen Northern Blot Analyse eine besonders große Transkriptmenge der isolierten ACC Oxidase in anaerob (<1% O₂, 20% CO₂) inkubiertem Fruchtgewebe nachgewiesen (Abb. 21).

S-Adenosyl-L-Methionin wird durch die ACC Synthase in die zyklische Aminosäure 1-Aminocyclopropan-1-carboxylsäure (ACC) umgewandelt und anschließend durch die ACC Oxidase zu Ethylen oxidiert. Für diese oxidative Ringspaltung von ACC zu Ethylen, Cyanid und CO₂ benötigt die ACC Oxidase Fe²⁺ als Cofaktor, Ascorbat als Cosubstrat und molekularen Sauerstoff (Thrower *et al.*, 2001). Da diese Reaktion also Sauerstoff-abhängig ist, kann unter Anaerobiose keine Ethylensynthese erfolgen.

Sowohl in Enzym Assays als auch in Western Blots wurde gezeigt, dass die Proteinmengen der drei ACC Oxidasen aus Tomate pTOM13, GTOMA, pHTOM5 sowie ihre Enzymaktivität mit der Transkriptmenge ansteigen (LeACO1-3; Holdsworth *et al.*, 1987a+b; Barry *et al.*, 1996). D.h. ihre Genexpression wird transkriptionell reguliert. Dabei umfasst die Induktion verschiedene Gewebetypen und zahlreiche Entwicklungsstadien der Pflanzen. Die Transkripte aller drei ACC Oxidasen werden, allerdings mit Unterschieden in ihrer zeitlichen Kinetik, während der Blütenentwicklung detektiert. Seneszenz der Blätter, Früchte und Blüten führt zur mRNA Akkumulation von LeACO1 und LeACO3 (Barry *et al.* 1996). Transkriptionelle Induktion der LeACO1 wurde auch nach Verwundung von Blättern und grünen Früchten beobachtet (Holdsworth *et al.*, 1987). Die LeACO4 wurde aus reifen Tomatenfrüchten isoliert (Nakatsuka *et al.* 1998). Sie wird, ebenso wie LeACO1, in jungen Früchten, in denen noch keine erhöhte Ethylenproduktion stattfindet, transkribiert. In reifenden Früchten steigt ihre Transkriptmenge stark an. Durch Behandlung mit MCP (1-Methylcyclopropen), einem Ethyleninhibitor, kann diese Zunahme jedoch zu einem großen Anteil unterdrückt werden, was auf eine positive Feedback Regulation der LeACO4 Transkription durch Ethylen hinweist (Nakatsuka *et al.*, 1998).

LeACO5 ist, wie die anderen ACC Oxidasen, ein Enzym zur Synthese des pflanzlichen Hormons Ethylen. Allerdings wird ihre Expression Anaerobiose-spezifisch induziert. Die Bedeutung der LeACO5 als neuem Mitglied der ACC Oxidase Familie in Tomate ist noch ungeklärt.

Aufgrund seiner höchsten Homologie zu LeACO4 könnte LeACO5 möglicherweise funktionell ähnlich wie LeACO4 wirken. Sollte die Transkription von LeACO5 ebenfalls durch positive Feedback Regulation des Ethylens kontrolliert werden, so könnte die Interaktion von ABZ1 mit LeACO5 der Feinregulation der Ethylensynthese dienen. Nach Interaktion mit ABZ1 wäre LeACO5 nicht mehr in der Lage mit seinem katalytischen Zentrum an ACC zu binden. Als Folge würde die Ethylensynthese reduziert und die positive Feedback Regulation unterbrochen werden. ABZ1 würde dann als Regulator der

Ethylensynthese im Cytosol aktiv sein. Demnach wäre der ABZ1 Faktor zusätzlich zur Transkriptionskontrolle unerwarteterweise auch in die Regulation der Synthese von Sekundärmetaboliten involviert. Dieser spekulative Regulationsmechanismus würde auf einer Protein-Protein Interaktion beruhen, die durch die Leucin-Zipper Domänen von ABZ1 und LeACO5 vermittelt wird. In zahlreichen 2-Oxoglutarat-abhängigen Dioxygenasen bilden putative Leucin-Zipper einen Teil ihrer konservierten amphipatischen α -Helix (Lukacin *et al.*, 2000). Allerdings stellen diese das katalytische Zentrum des Enzyms dar, und in Cross-linking Experimenten wurde gezeigt, dass sie nicht zur Interaktion mit anderen Peptiden zur Verfügung stehen (Roach *et al.*, 1995). Da im Yeast Two Hybrid Screen jedoch zwei unabhängige Klone von LeACO5 als ABZ1 Interaktionspartner isoliert wurden, könnte dies für die Evidenz dieser Interaktion sprechen. Desweiteren besitzt LeACO5 im Vergleich zu den bisher beschriebenen ACC Oxidasen aus Tomate den längsten Leucin-Zipper. Aufgrund dieser Beobachtungen könnte das neue, anaerob induzierte Mitglied der ACC Oxidase Familie aus Tomate, LeACO5, möglicherweise Interaktionen eingehen, die der Regulation der Ethylensynthese unter Anaerobiose dienen. Weitere Untersuchungen mit dem vollständigen LeACO5 Protein könnten Aufschluß über seine funktionelle Bedeutung liefern.

5. Zusammenfassung

Pflanzen reagieren mit einer Vielzahl von Adaptionsmechanismen, um unter anaeroben Bedingungen überleben zu können und internem Sauerstoffmangel entgegen zu wirken. Ein verringerter und effizienterer Sauerstoffverbrauch, morphologische Veränderungen, die eine gesteigerte Sauerstoffaufnahme ermöglichen, sowie die Umstellung des Metabolismus auf Stoffwechselwege, die die ATP-Gewinnung aufrecht erhalten und der Schädigung der Pflanze entgegenwirken, basieren größtenteils auf veränderter Genexpression. Allerdings sind viele Aspekte der anaeroben Stress-Antwort noch unklar, insbesondere im Hinblick auf die Regulation anaerob reprimierter Gene. Deshalb besteht ein großes Interesse an der weiteren Aufklärung der komplexen Zusammenhänge der anaeroben Signaltransduktion sowie der differentiellen Transkriptions- und Translationsvorgänge unter Sauerstoffmangel.

Durch Einsatz der Suppression Subtractive Hybridization (SSH) wurden Gene identifiziert, deren Transkription unter anaeroben Bedingungen induziert ist. Unter den anaerob aktivierten und isolierten Genen sind viele, deren Funktion als Proteine des anaeroben Metabolismus bereits bekannt ist. Diese sind überwiegend in den Kohlenstoffmetabolismus der Glykolyse und der Fermentation involviert. Außerdem konnten Komponenten der Signaltransduktion und der Genexpression identifiziert werden. So wurden u.a. zum ersten Mal ein anaerob induzierter Transkriptionsfaktor mit NAC-Domäne (ANA) sowie ein anaerob spezifischer bZIP Transkriptionsfaktor (ABZ1) aus Tomate isoliert. Diese wurden strukturell und funktionell analysiert, wobei der Schwerpunkt auf den Untersuchungen von ABZ1 lag.

Die Expression des ANA Gens wird anaerob-spezifisch präferentiell in den Blättern von Tomatenpflanzen induziert. Das 301 Aminosäuren große NAC Protein (ANA) weist im Homologievergleich eine 97%ige Sequenzidentität zu StNAC auf, einem NAC-Protein aus Kartoffel, das durch Pathogeninfektion induziert wird. Die *in silico* Analyse zeigt, dass die hoch konservierte und charakteristische NAC-Domäne den N-Terminus von ANA umfasst, und ANA kein typisches Signalpeptid zur Kernlokalisierung besitzt. Durch histochemische Untersuchungen von Zwiebelepidermiszellen nach transienter Expression von ANA-GUS-Fusionsproteinen konnte jedoch ein teilweiser Transport von ANA in den Nucleus nachgewiesen werden. In Hefe zeigt ANA einen transaktivierenden Effekt, der auf eine C-terminale Aktivierungsdomäne zurückzuführen ist. Allerdings beträgt seine transkriptionsaktivierende Wirkung nur ca. 23% der Aktivität des GAL4 Aktivators, was eine relativ schwache Aktivierungswirkung von ANA vermuten lässt.

Obwohl im Gelshift Experiment eine sequenzspezifische Bindungsaktivität von rekombinantem ANA an den CaMV 35S Promotor nachgewiesen werden konnte, führt ANA nach Cotransformation mit dem Promotor-Reportergen Konstrukt 35S-GUS in Tabak unter aeroben Bedingungen nicht zur erwarteten Hochregulation der Aktivität des 35S Promotors. Stattdessen wird bei Coexpression von ANA ein Rückgang der Reportergenaktivität beobachtet. Die Ursachen dafür werden diskutiert und bedürfen weiterer Analysen.

Die Expression des ABZ1 Gens wird unter anaeroben Bedingungen in Blättern, Früchten und Wurzeln gleichermaßen stark induziert. Sein Transkript verfügt über einen auffallend langen 5'Leader von 596 Nucleotiden, während ABZ1 ein mit 138 Aminosäuren relativ kleiner bZIP Faktor ist. Die mit 86% höchste Sequenzidentität zeigt ABZ1 zu BZI-4, einem bZIP Transkriptionsfaktor aus Tabak. Durch *in silico* Analyse der ABZ1-Primärstruktur wurde die charakteristische bZIP Domäne an zentraler Position im Protein identifiziert. Die bZIP Domäne setzt sich aus einem Bereich mit einem hohen Anteil basischer Aminosäuren und einem C-terminal benachbarten Leucin-Zipper zusammen. Der Leucin-Zipper besteht aus 5 Leucinen und einem Isoleucin, die in einem Abstand von exakt 7 Aminosäuren auftreten. Ein zweigeteiltes Signalpeptid zur Kernlokalisierung konnte experimentell auf die Aminosäuren 25 bis 44, die innerhalb der basischen Region liegen, eingeschränkt werden. Die aus einem Random Binding Site Selection Assay hervorgegangenen 18 putativen Zielsequenzen für ABZ1 führen zu folgender Consensus Sequenz: KKNTKACGTGGNNN. Gelshift Experimente mit einigen der selektierten Zielsequenzen demonstrieren, dass ABZ1 G-Box ähnliche Motive bindet, wobei die ACGT Core Sequenz essentiell ist. Die flankierenden Nucleotide wirken sich auf Bindungsstärke und -spezifität aus. ABZ1 bindet als Dimer über seine DNA-Bindungsdomäne, die innerhalb der 46 N-terminalen Aminosäuren liegt, an Zielsequenzen. Dieser N-Terminus beinhaltet die basische Domäne, spielt jedoch für die Protein-Protein-Interaktion von ABZ1 keine Rolle. *In vitro* konnte gezeigt werden, dass die DNA Bindung des Dimers das Vorhandensein der DNA-Bindungsdomäne in beiden interagierenden Monomeren erforderlich ist. Außerdem konnte eine spezifische Bindung von ABZ1 an den CaMV 35S Promotor nachgewiesen werden, dessen Aktivität nach transienter Coexpression von ABZ1 in Tabakblättern reduziert ist. Dieses Ergebnis korreliert mit der Beobachtung, dass die Aktivität des CaMV 35S Promotors im transienten Expressionssystem von Tabak und Tomate unter Anaerobiose deutlich schwächer ist als unter normoxischen Bedingungen. Daraus resultiert die Annahme, dass ABZ1 unter Anaerobiose induziert wird, um die Expression anderer Gene zu reprimieren. Im Yeast Two Hybrid System wurden anaerob induzierte Peptide isoliert, die

mit ABZ1 heterodimerisieren. Sie alle zeichnen sich durch einen Leucin-Zipper aus, der für die Interaktion mit ABZ1 wichtig ist. Zusätzlich sind sie teilweise in die Signaltransduktion involviert, so wie z.B. das anaerob induzierte IDS4-like Protein (AIL). AIL besitzt N-terminal eine SPX-Domäne, über die es mit G-Proteinen, die für die Signalweiterleitung von Bedeutung sind, interagieren könnte. Außerdem interagiert ABZ1 potentiell mit einem neuen Mitglied der ACC Oxidase Familie (LeACO5), die ein wichtiges Enzym der Ethylensynthese darstellt. Die Bedeutung sowie mögliche Konsequenzen dieser Interaktionen für die Antwort auf Anaerobiose-Stress werden diskutiert.

6. Literaturverzeichnis

- Abe, H., Urao, T., Ito, T., Seki, M., Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K. (2003). Arabidopsis ATMYC2 (bHLH) and AtMYB2 (MYB) function as transcriptional activators in abscisic acid signaling. *Plant Cell* (15): 63-78
- Aguan, K., Sugawara, K., Suzuki, N., Kusano, T. (1993). Low temperature-dependent expression of a rice gene encoding a protein with a leucin-zipper motif. *Mol. Gen. Genet.* (240): 1-8
- Aida, M., Ishida, T., Fukaki, H., Fujisawa, H., Tasaka, M. (1997). Genes involved in organ separation in Arabidopsis: an analysis of the cup-shaped cotyledon mutant. *Plant Cell* (9): 841-857
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang J., Zhang Z., Miller, W., Lipman, D.J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucl. Acids Res.* (25): 3389-3402
- Andrews, D.L., McAlpine, D.M., Cobb, B.G., Johnson, J.R., Drew, M.C. (1994). Differential induction of mRNAs for the glycolytic and ethanolic fermentative pathways by hypoxia and anoxia in maize seedlings. *Plant Physiol.* (106): 1575-1582
- Armstrong, W. (1979). Aeration in higher plants. In: Woolhouse HW, ed. *Advances in botanical research* (7), New York, Academic Press: 225-232
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seldman, J.G., Smith, J.A., Struhl, K. (1988). *Current protocols in molecular biology*. Green and Wiley Interscience, New York
- Bailey-Serres, J., Dawe, R.K. (1996). Both 5' and 3' sequences of maize adh1 mRNA are required for enhanced translation under low-oxygen conditions. *Plant Physiol.* (112): 685-695
- Bailey-Serres, J., Freeling, M. (1990). Hypoxic stress-induced changes in ribosomes of maize seedling roots. *Plant Physiol.* (94): 1237-1243
- Barry, C.S., Blume, B., Bouzayen, M., Cooper, W., Hamilton, A.J., Gierson, D. (1996). Differential expression of the 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase gene family of tomato. *Plant J.* (9): 525-535
- Battini, J.L., Rasko, J.E., Miller, A.D. (1999). A human cell-surface receptor for xenotropic and polytropic murine leukaemia viruses: possible role in G protein-coupled signal transduction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (96): 1385-1390

- Baxter-Burrell, A., Yang, Z., Springer, P.S., Bailey-Serres, J. (2002). RopGAP4-dependent Rop GTPase rheostat control of Arabidopsis oxygen deprivation tolerance. *Science* (296): 2026-2028
- Bleecker, A.B., Kende, H. (2000). Ethylene: a gaseous signal molecule in plants. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* (16): 1-18
- Bouny, J.M., Saglio, P.H. (1996). Glycolytic flux and hexokinase activities in anoxic maize root tips acclimated by hypoxic pretreatment. *Plant Physiol.* (111): 187-194
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. *Anal. Biochem.* (72): 248-254
- Bucher, M., Brändle, R., Kuhlemeier, C. (1994). Ethanolic fermentation in transgenic tobacco expressing *Zymomonas mobilis* pyruvate decarboxylase. *EMBO J.* (13): 2755-2763
- Bülow, L., Köhler, U., Cerff, R., Hehl, R., Düring, K. (1999). Induction of the maize *GapC4* promoter in transgenic potato under anaerobiosis and in *Erwinia carotovora*-inoculated tuber tissue. *Molecular Plant-Microbe Interactions* (12): 182-188
- Caturla, M., Chaparro, C., Schroeyers, K., Holsters, M. (2002). Suppression subtractive hybridization to enrich low-abundance and submergence-enhanced transcripts of adventitious root primordia of *Sesbania rostrata*. *Plant Science* (162): 915-921
- Cavener, D.R. (1987). Comparison of the consensus sequence flanking translational start sites in *Drosophila* and vertebrates. *Nucleic Acids Res.* (15): 1351-1361
- Chang, W.W., Huang, L., Shen, M., Webster, C., Burlingame, A.L., Roberts, J.K. (2000). Patterns of protein synthesis and tolerance of anoxia in root tips of maize seedlings acclimated to a low-oxygen environment, and identification of proteins by mass spectrometry. *Plant Physiol.* (122): 295-318
- Chen, W. et al. (2002). Expression profile matrix of Arabidopsis transcription factor genes suggests their putative functions in response to environmental stresses. *Plant Cell* (14): 559-574
- Collinge, M., Boller, T. (2001). Differential induction of two potato genes, Stprx2 and StNAC, in response to infection by *Phytophthora infestans* and to wounding. *Plant Mol Biol* (46): 521-529
- Cox, M.C., Millenaar, F.F., van Berkel, Y.E., Peeters, A.J., Voesenek, L.A. (2003). Plant movement. Submergence-induced petiole elongation in *Rumex palustris* depends on hyponastic growth. *Plant Physiol.* (132): 282-291

- Davies, J.M., Poole, R.J., Sanders, D. (1993). The computed free energy change of hydrolysis of inorganic pyrophosphate and ATP: apparent significance for inorganic-pyrophosphate-driven reactions of intermediary metabolism. *Biochim. Biophys. Acta* (1141): 29-36
- Dennis, E.S., Dolferus, R., Ellis, M., Rahman, M., Wu, Y., Hoeren, F.U., Grover, A., Ismond, K.P., Good, A.G., Peacock, W.J. (2000). Molecular strategies for improving waterlogging tolerance in plants. *J. Exp. Bot.* (51): 89-97
- De Vetten, N.C., Ferl, R.J. (1995). Characterization of a maize G-box binding factor that is induced by hypoxia. *Plant J.* (7): 589-601
- De Wet, J.R. , Wood, K.V. , DeLuca, M., Helinski, D.R., Subramani (1987). Firefly luciferase gene: structure and expression in mammalian cells. *Mol. Cell Biol.* (7): 725-737
- Diatchenko, L., Lau, Y.-F.C., Campell, A.P., Chenchik, A., Moqadam, F., Huang, B., Lukyanov, S., Lukyanov, K., Gurskaya, N., Sverdlov, E.D., Siebert, P.D. (1996). Suppression subtractive hybridization: A method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (93): 6025-6030
- Dolferus, R., Jacobs, M., Peacock, W.J., Dennis, E.S. (1994). Differential interactions of promoter elements in stress responses of the *Arabidopsis Adh* gene. *Plant Physiol.* (105): 1075-1087
- Drew, M. (1997). Oxygen deficiency and root metabolism: injury and acclimation under hypoxia and anoxia. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* (48): 223-250
- Drew, M.C., He, C.-J., Morgan, P.W. (2000). Programmed cell death and aerenchyma formation in roots. *Trends Plant Sci.* (5): 123-127
- Duval, M., Hsieh, T.-F., Kim, S.Y., Thomas, T.L. (2002). Molecular characterization of *AtNAM*: a member of the *Arabidopsis* NAC domain superfamily. *Plant Mol Biol* (50): 237-248
- Eckhard, U., Mas Marques, A., Buckhout, T.J. (2001). Two iron-regulated cation transporters from tomato complement metal uptake-deficient yeast mutants. *Plant Mol. Biol.* (45): 437-448
- Ellis, M.H., Dennis, E.S., Peacock, W.J. (1999). *Arabidopsis* roots and shoots have different mechanisms for hypoxic stress tolerance. *Plant Physiol.* (119): 57-64
- Feldbrügge, M., Hahlbrock, K., Weisshaar, B. (1996). The transcriptional regulator CPRF1 expression analysis and gene structure. *Mol. Gen. Genet.* (251): 619-627

- Fennoy, S.L., Bailey-Serres, J. (1995). Post-transcriptional regulation of gene expression in oxygen-deprived roots of maize. *Plant J.* (7): 287-295
- Fennoy, S.L., Nong, T., Bailey-Serres, J. (1998). Transcriptional and post-transcriptional processes regulate gene expression in oxygen-deprived roots of maize. *Plant J.* (15): 727-735
- Fox, T.C., Gueriot, M.L. (1998). Molecular biology of cation transport in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* (49): 669-696
- Franco-Obregon, A., Urena, J., Lopez-Barneo, J. (1995). Oxygen-sensitive calcium channels in vascular smooth muscle and their possible role in hypoxic arterial relaxation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (92): 4715-4719
- Geffers, R., Cerff, R., Hehl, R. (2000). Anaerobiosis-specific interaction of tobacco nuclear factors with *cis*-regulatory sequences in the maize *GapC4* promoter. *Plant Mol. Biol.* (43): 11-21
- Geigenberger, P. (2003). Response of plant metabolism to too little oxygen. *Curr. Opin. Plant Biol.* (6): 247-256
- Geigenberger, P., Fernie, A.R., Gibon, Y., Christ, M., Stitt, M. (2000). Metabolic activity decreases as an adaptive response to low internal oxygen in growing potato tubers. *Biol. Chem.* (381): 723-740
- Germain, V., Ricard, B., Raymond, P., Saglio, P.H. (1997). The role of sugars, hexokinase, and sucrose synthase in the determination of hypoxically induced tolerance to anoxia in tomato roots. *Plant Physiol.* (114): 167-175
- Gibbs, J., de Bruxelles, G., Armstrong, W., Greenway, H. (1995). Evidence for anoxic zones in 2-3 mm tips of aerenchymatous maize roots under low O₂ supply. *Aust. J. Plant Physiol.* (22): 723-730
- Gibon, Y., Vigeolas, H., Tiessen, A., Geigenberger, P., Stitt, M. (2002). Sensitive and high throughput metabolite assays for inorganic pyrophosphate, ADPGlc, nucleotide phosphates, and glycolytic intermediates based on a novel enzymic cycling system. *Plant J.* (30): 221-235
- Gong, W., Tao, B., Mansy, S.S., Gonzalez, G., Gilles-Gonzalez, M.A., Chan, M.K. (1998). Structure of a biological oxygen sensor: a new mechanism for heme-driven signal transduction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (95): 15177-15182
- Good, A.G., Paetkau, D.H. (1992). Identification and characterization of a hypoxically induced maize lactate dehydrogenase gene. *Plant Mol. Biol.* (19): 693-697

- Gout, E., Boisson, A.-M., Aubert, S., Douce, R., Bligny, R. (2001). Origin of the cytoplasmic pH changes during anaerobic stress in higher plant cells: carbon-13 and phosphorous-31 nuclear magnetic resonance studies. *Plant Physiol.* (125): 912-925
- Haas, B.J., Volfovsky, N., Town, C.D., Troukhan, M., Alexandrov, N., Feldmann, K.A., Flavell, R.B., White, O., Salzberg, S.L. (2002). Full-length messenger RNA sequences greatly improve genome annotation. *Genome Biol.* (3), RESEARCH0029
- Halliday, K.J. and Frankhauser, C. (2003). Phytochrome-hormonal signalling networks. *New Phytologist* (157): 449-463
- Harter, K., Kirchner, S., Frohnmeier, H., Krenz, M., Nagy, F., Schäfer, E. (1994). Light-regulated modification and nuclear translocation of cytosolic G-box binding factors in parsley. *Plant Cell* (5): 545-559
- He, C.J., Morgan, P.W., Drew, M.C. (1996). Transduction of an ethylene signal is required for cell death and lysis in the root cortex of maize during aerenchyma formation induced by hypoxia. *Plant Physiol.* (112): 463-472
- Heinekamp, T., Kuhlmann, M., Lenk, A., Strathmann, A., Dröge-Laser, W. (2002). The tobacco bZIP transcription factor BZI-1 binds to G-box elements in the promoters of phenylpropanoid pathway genes *in vitro*, but it is not involved in their regulation *in vivo*. *Mol. Genet. Genomics* (267): 16-26
- Herbik, A., Giritch, A., Horstmann, C., Becker, R., Balzer, H.-J., Bäumlein, H., Stephan, U.W. (1996). Iron and copper nutrition-dependent changes in protein expression in a tomato wild type and the nicotianamine-free mutant chloronerva. *Plant Physiol.* (111): 533-540
- Hoeren, F.U., Dolferus, R., Wu, Y., Peacock, W.J., Dennis, E.S. (1998). Evidence for a role of AtMYB2 in the induction of the Arabidopsis alcohol dehydrogenase gene (ADH1) by low oxygen. *Genetics* (149): 479-490
- Holdsworth, M.J., Bird, C.R., Ray, J., Schuch, W., Grierson, D. (1987a). Structure and expression of an ethylene-related mRNA from tomato. *Nucl. Acids Res.* (15): 731-739
- Holdsworth, M.J., Schuch, W., Grierson, D. (1987b). Nucleotide sequence of an ethylene-related gene from tomato. *Nucleic Acids Res.* (15): 10600
- Homna, M.A., Baker, B.J., Waddell, C.S. (1993). High-frequency transposition of Ds-ALS in Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (90): 6242-6246

- Hood, E.E., Gelvin, S.B., Melchers, L.S., Hoekema, A. (1993). New *Agrobacterium* helper plasmids for gene transfer to plants. *Transgen. Res.* (2): 208-218
- Huang, S., Jeffery, D.A., Anthony, M.D., O'Shea, E.K. (2001). Functional analysis of the cyclin-dependent kinase inhibitor Pho81 identifies a novel inhibitory domain. *Mol. Cell. Biol.* (21): 6695-6705
- Hunt, P.W., Klok, E.J., Trevaskis, B., Watts, R.A., Ellis, M.H., Peacock, W.J., Dennis, E.S. (2002). Increased level of hemoglobin 1 enhances survival of hypoxic stress and promotes early growth in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (99): 17197-17202
- Igarashi, D., Ispida, S., Frkzawa, J., Takahashi, Y. (2001). 14-3-3 proteins regulate intracellular localization of the bZIP transcriptional activator RSG. *Plant Cell* (13): 2483-2497
- Isono, K., Yamamoto, H., Satoh, K., Kobayashi, H. (1999). An *Arabidopsis* cDNA encoding a DNA-binding protein that is highly similar the the DEAH family of RNA/DNA helicase genes. *Nucleic Acids Res.* 27 (18): 3728-3735
- IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature (1971). Abbreviations and symbols for nucleic acids, polynucleotides and their constituents. *Arch. Biochem. Biophys.* (145): 425-436
- Ito, O., Ella, E., Kawano, N. (1999). Physiological basis of submergence tolerance in rainfed lowland rice ecosystem. *Field Crop Res.* (64): 75-90
- Izawa, T., Foster, R., Chua, N.-H. (1993). Plant bZIP protein DNA binding specificity. *J. Mol. Biol.* (230): 1131-1144
- Jakoby, M., Weisshaar, B., Dröge-Laser, W., Vincente-Carbajosa, J., Tiedemann, J., Kroj, T., Parcy, F. (2002). bZIP transcription factors in *Arabidopsis*. *Trends in Plant Science* (7): 106-111
- Jefferson, R.A. (1987). Assaying chimeric genes in plants: the GUS gene fusion system. *Plant Mol. Biol. Rep.* (5): 387-405
- Jefferson, R.A., Kavanagh, T.A., Bevan, M.W. (1987). GUS fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J.* (6): 3901-3907
- Kato-Noguchi, H. (2000). Absciscic acid and hypoxic induction of anoxia tolerance in roots of lettuce seedlings. *J. Exp. Bot.* (51): 1939-1944
- Kee, Y., Yoo, J.S., Hazuka, C.D., Peterson, K.E., Hsu, S.C., Scheller, R.H. (1997). Subunit structure of the mammalian exocyst complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (94): 14438-14443

- Kikuchi, K., Ueguchi-Tanaka, M., Yoshida, K.T., Nagato, Y., Matsusoka, M., Hirano, H.-Y. (2000). Molecular analysis of the NAC gene family in rice. *Mol. Gen. Genet.* (262): 1047-1051
- Kircher, S., Wellmer, F., Nick, P., Rügner, A., Schäfer, E., Harter, K. (1999). Nuclear import of the parsley bZIP transcription factor CPRF2 is regulated by phytochrome photoreceptors. *J. Cell Biol.* (144): 201-211
- Klein, T.M., Gradziel, T., Fromm, M.E., Sanford, J.C. (1988). Factors influencing gene delivery into *Zea mays* cells by high-velocity microprojectiles. *Bio/Tech.* (6): 559-563
- Klok, E.J., Wilson, I.W., Wilson, D., Chapman, S., Ewing, R.M., Somerville, S.C., Peacock, W.J., Dolferus, R., Dennis, E.S. (2002). Expression profile analysis of the low-oxygen response in arabidopsis root cultures. *Plant Cell* (14): 2481-2494
- Köhler, U., Liaud, M.F., Mendel, R.R., Cerff, R., Hehl, R. (1995). The maize GapC4 promoter confers anaerobic reporter gene expression and shows homology to the maize anthocyanin regulatory locus C1. *Plant Mol. Biol.* (29): 1293-1298
- Köhler, U., Mendel, R., Cerff, R., Hehl, R. (1996). A promoter for strong and ubiquitous anaerobic gene expression in tobacco. *Plant J.* (10): 175-183
- Köhler, U., Donath, M., Mendel, R.R., Cerff, R., Hehl, R. (1996). Intron-specific stimulation of anaerobic gene expression and splicing efficiency in maize cells. *Mol. Gen. Genet.* (251): 252-258
- Krawczyk, S., Thurow, C., Niggeweg, R., Gatz, C. (2002). Analysis of the spacing between the two palindromes of activation sequence-1 with respect to binding to different TGA factors and transcriptional activation potential. *Nucleic Acids Res.* (30): 775-781
- Kuhlmann, M., Horvay, K., Strathmann, A., Heinekamp, T., Fischer, U., Bottner, S., Dröge-Laser, W. (2003). The alpha-helical D1 domain of the tobacco bZIP transcription factor BZI-1 interacts with the ankyrin-repeat protein ANK1 and is important for BZI-1 function, both in auxin signaling and pathogen response. *J. Biol. Chem.* (278): 8786-8794
- Kusano, T., Berberich, T., Harada, M., Suzuki, N., Sugawara, K. (1995). A maize DNA-binding factor with a bZIP motif is induced by low temperature. *Mol. Gen. Genet.* (248): 507-517
- Kusano, T., Sugawara, K., Harada, M., Berberich, T. (1998). Molecular cloning and partial characterization of a tobacco cDNA encoding a small bZIP protein. *Biochim. Biophys. Acta* (1395): 171-175

- Lam, E., Lam, Y. K. (1995). Binding site requirements and differential representation of TGF factors in nuclear ASF-1 activity. *Nucleic Acids Res.* (23): 3778-3785
- Lasserre, E., Bouquin, T., Hernandez, J.A., Bull, J., Pech, J.-C., Balague, C. (1996). Structure and expression of three genes encoding ACC oxidase homologs from melon (*Cucumis melo* L.). *Mol. Gen. Genet.* (251): 81-90
- Lee, M., O'Regan, S., Moreau, J.L., Johnston, L.H., Godine, C.R. (2000). Regulation of the Pcl7-Pho85 cyclin-cdk complex by Pho81. *Mol. Microbiol.* (38): 411-422
- Loef, I., Stitt, M., Geigenberger, P. (2001). Increased adenine nucleotide levels modify the interaction between respiration and starch synthesis when adenine is fed to discs of growing potato tubers. *Planta* (212): 782-791
- López-Barneo, J., Pardal, R., Ortega-Sáenz, P. (2001). Cellular mechanisms of oxygen sensing. *Annu. Rev. Physiol.* (63): 259-287
- Lukacin, R., Urbanke, C., Gröning, I., Matern, U. (2000). The monomeric polypeptide comprises the functional flavanone 3b-hydroxylase from *Petunia hybrida*. *FEBS Letters* (467): 353-358
- Magaraggia, F., Solinas, G., Valle, G., Giovinazzo, G., Coraggio, I. (1997). Maturation and translation mechanisms involved in the expression of a myb gene of rice. *Plant Mol. Biol.* (35): 1003-1008
- Maliga, P., Sz-Brenovits, A., Marton, L., Joo, F. (1975). Non-Mendelian streptomycin-resistant tobacco mutant with altered chloroplasts and mitochondria. *Nature* (255): 401-402
- Martinez-Garcia, J.F., Moyano, E., Alcocer, M.J.C., Martin, C. (1998). Two bZIP proteins from *Antirrhinum* flowers preferentially bind a hybrid C-bos/G-box motif and help to define a new sub-family of bZIP transcription factors. *Plant J.* (13): 489-505
- Meier, I. und Grissem, W. (1994). Novel conserved sequence motifs in plant G-box binding proteins and implications for interactive domains. *Nucleic Acids Res.* (22): 470-478
- Meissner, R., Jacobson, Y., Melamed, S., Levyatuv, S., Shalev, G., Ashri, A., Elkind, Y., Levy, A. (1997). A new model system for tomato genetics. *Plant J.* (12): 1465-1472
- Menegus, F., Cattaruzza, L., Chersi, A., Fronza, G. (1989). Differences in the anaerobic lactate-succinate production and the changes of cell sap pH for plants with high and low resistance to anoxia. *Plant Physiol* (90): 29-32

- Meyer-Gauen, G., Herbrand, H., Pahnke, J., Cerff, R., Martin, W. (1998). Gene structure, expression in *Escherichia coli* and biochemical properties of the NAD⁺-dependent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Pinus sylvestris* chloroplasts. *Gene* (209): 167-174
- Nakanishi, H., Okumura, N., Umehara, Y., Nishizawa, N.-K., Chino, M., Mori, S. (1993). Expression of a gene specific for iron deficiency (*Ids3*) in the roots of *Hordeum vulgare*. *Plant Cell Physiol.* (34): 401-410
- Nakatsuka, A., Murachi, S., Okunishi, H., Shiomi, S., Nakano, R., Kubo, Y., Inaba, A. (1998). Differential expression and internal feedback regulation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase, 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase, and ethylene receptor genes in tomato fruit during development and ripening. *Plant Physiol.* (118): 1295-1305
- Ober, E.S., Sharp, R.E. (1996). A microsensor for direct measurement of O₂ partial pressure within plant tissues. *J. Exp. Bot.* (47): 447-457
- Okumura, N., Nishizawa, N.-K., Umehara, Y., Mori, S. (1991). An iron deficiency-specific cDNA from barley roots having two homologous cystein-rich MT domains. *Plant Mol. Biol.* (17): 531-533
- Okumura, N., Nishizawa, N.-K., Umehara, Y., Ohata, T., Nakanishi, H., Yamaguchi, T., Chino, M., Mori, S. (1994). A dioxygenase gene (*Ids2*) expressed under iron deficiency conditions in the roots of *Hordeum vulgare*. *Plant Mol. Biol.* (25): 705-719
- Olive, M.R., Peacock, W.J., Dennis, E.S. (1991). The anaerobic responsive element contains two GC-rich sequences essential for binding a nuclear protein and hypoxic activation of the maize *Adh1* promoter. *Nucl. Acids Res.* (19): 7053-7060
- Olson, D.C., Oetiker, J.H., Yang, S.F. (1995). Analysis of LE-ACS3 a 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase gene expressed during flooding in the roots of tomato plants. *J. Biol. Chem.* (270): 14056-14061
- Palmgren, M.G. (2001). Plant plasma membrane H⁺-ATPases: powerhouses for nutrient uptake. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* (52): 817-845
- Paul, A.L., Ferl, R.J. (1991). In vivo footprinting reveals unique cis-elements and different modes of hypoxic induction in maize *Adh1* and *Adh2*. *Plant Cell* (3): 159-168
- Paul, A.L., Ferl, R.J. (1997). The hypoxic response of three alcohol dehydrogenase genes: *In vivo* and *in vitro* footprinting of DNA/protein interactions describes multiple signalling connections. *Annals of Botany* (79, Supplement A): 33-37

- Peng, H.-P., Chang, C.-S., Shih, M.-C., Yang, S.F. (2001). Signaling events in the hypoxic induction of alcohol dehydrogenase gene in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* (126): 742-749
- Pfützner, A. J. P. (1998). Transformation of tomato. *Methods Mol. Biol.* (81):359-363
- Piper, P. (1996). Isolation of yeast DNA. *Methods Mol. Biol.* (53): 103-107
- Quinn, J.M., Eriksson, M., Moseley, J.L., Merchant, S. (2002). Oxygen deficiency responsive gene expression in *Chlamydomonas reinhardtii* through a copper-sensing signal transduction pathway. *Plant Physiol.* (128): 463-471
- Rebrikov, D.V., Britanova, O.V., Gurskaya, N.G., Lukyanov, K.A., Tarabykin, V.S., Lukyanov, S.A. (2000). Mirror orientation selection (MOS): a method for eliminating false positive clones from libraries generated by suppression subtractive hybridization. *Nucleic Acids Res.* (28), No. 20 e90
- Reintanz, B. (1997). Funktionelle Charakterisierung der Kaliumkanal α -Untereinheit AtKC1 aus *Arabidopsis thaliana*. Ph.D. Thesis. Cologne, Germany, University of Cologne
- Ren, T., Qu, F., Morris, T.J. (2000). *HRT* gene function requires interaction between a NAC protein and viral capsid protein to confer resistance to turnip crinkle virus. *Plant Cell* (12): 1917-1925
- Ricard, B., Couée, I., Raymond, P., Saglio, P.H., Saint-Ges, V., Pradet, A. (1994). Plant metabolism under hypoxia and anoxia. *Plant Physiol. Biochem.* (32): 1-10
- Rivoal, J., Hanson, A.D. (1994). Metabolic control of anaerobic glycolysis: overexpression of lactate dehydrogenase in transgenic tomato roots supports the Davies-Roberts hypothesis and points to a critical role for lactate secretion. *Plant Physiol.* (106): 1179-1185
- Roach, P.L., Clifton, I.J., Fülöp, V., Harlos, K., Barton, G.J., Hajdu, J., Andersson, I., Schofield, C.J., Baldwin, J.E. (1995). Crystal structure of isopenicillin N synthase is the first from a new structural family of enzymes. *Nature* (375): 700-704
- Robbins, J., Dilworth, S.M., Laskey, R.A., Dingwall, C. (1991). Two interdependent basic domains in nucleoplasmin nuclear targeting sequence: identification of a class of bipartite nuclear targeting sequence. *Cell* (64): 615-623
- Roberts, J.K.M., Callis, J., Jardetzky, O., Walbot, V., Freeling, M. (1984). Cytoplasmic acidosis as a determinant of flooding intolerance in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (81): 6029-6033

- Robinson, N.J., Procter, C.M., Connolly, E.L., Guerinot, M.L. (1999). A ferric-chelate reductase for iron uptake from soils. *Nature* (397): 694-697
- Römheld, V., Müller, C., Marschner, H. (1984). Localization and capacity of proton pumps in roots of intact sunflower plants. *Plant Physiol.* (76): 603-606
- Rolletscheck, H., Borisjuk, L., Koshcorreck, M., Wobus, U., Weber, H. (2002). Legume embryos develop in a hypoxic environment. *J. Exp. Bot.* (53): 1099-1107
- Rook, F., Gerrits, N., Kortstel, A., van Kampen, M., Borrias, M., Weisbeek, P., Smeekens, S. (1998). Sucrose-specific signalling represses translation of the Arabidopsis ATB2 bZIP transcription factor gene. *Plant J.* (15): 253-263
- Rügner, A., Frohnmeier, H., Näke, C., Wellmer, F., Kircher, S., Schäfer, E., Harter, K. (2001). Isolation and characterization of four novel parsley proteins that interact with the transcriptional regulators CPRF1 and CPRF2. *Mol. Genet. Genomics* (265): 964-976
- Ruiz-Medrano, R., Xononostle-Cázares, B., Lucas, W.J. (1999). Phloem long-distance transport of CmNACP mRNA: implications for supracellular regulation in plants. *Development* (126): 4405-4419
- Sachs, M.M., Freeling, M., Okimoto, R. (1980). The anaerobic proteins of maize. *Cell* (20): 761-767
- Sachs, M., Subbaiah, C., Saab, I. (1996). Anaerobic gene expression and flooding tolerance in maize. *J. Exp. Bot.* (47): 1-15
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989). Molecular cloning. A laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Sanford, J.C. (1988). The biolistic process. *Trends in Biotechnology* (6): 229-302
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain termination inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (74): 5463-5467
- Sauter, M., Rzewuski, G., Marwedel, T., Lorbiecke, R. (2002). The novel ethylen-regulated gene OsUsp1 from rice encodes a member of a plant protein family related to prokaryotic universal stress proteins. *J. Exp. Bot.* (53): 2325-2331

- Schafleitner, R., Wilhelm, E. (2002). Isolation of wound-responsive genes from chesnut (*Castanea sativa*) microstems by mRNA display and their differential expression upon wounding and infection with the chesnut blight fungus (*Cryphonectria parasitica*). *Physiol. Mol. Plant Pathol.* (61): 339-348
- Schindler, U., Cashmore, A.R. (1990). Photoregulated gene expression may involve ubiquitous DNA binding proteins. *EMBO J.* (9): 3415-3427
- Schledzewski, K., Mendel, R.R. (1994). Quantitative transient gene expression: comparison of the promoter for maize polyubiquitin1, rice actin1, maize derived Emu and CaMV 35S in cells of barley, maize and tobacco. *Transgenic Res.* (3): 249-255
- Schmitz, M.L., Baeuerle, P.A. (1997). Bacterial expression, purification and potential use of His-tagged GAL4 fusion proteins. Recombinant protein protocols: detection and isolation. *Methods of molecular biology* (63): 129-137. Humana Press
- Seki, M., Narusaka, M., Abe, H., Kasuga, M., Yamaguchi-Shinozaki, K., Carnici, P., Hayashizaki, Y., Shinozaki, K. (2001). Monitoring the expression pattern of 1300 Arabidopsis genes under drought and cold stresses by using a full-length cDNA microarray. *Plant Cell* (13): 61-72
- Shelp, B.J., Bown, A.W., McLead, M.D. (1999). Metabolism and functions of gamma-aminobutyric acid. *Trends Plant Sci.* (4): 446-451
- Singer, T., Yordan, C., Martienssen, R.A. (2001). Robertson's mutator transposons in *A. thaliana* are regulated by the chromatin-remodeling gene decrease in DNA methylation (DDM1). *Genes Dev.* (15): 591-602
- Smith, M.K., Day, D.A., Whelan, J. (1994). Isolation of a novel soybean gene encoding a mitochondrial ATP-Synthase subunit. *Arch. Biochem. Biophys.* (313): 235-240
- Souer, E., van Houwelingen, A., Kloos, D., Mol, J., Koes, R. (1996). The *no apical meristem* gene of petunia is required for pattern formation in embryos and flowers and is expressed at meristem and primordia boundaries. *Cell* (85): 159-170
- Spain, B.H., Koo, D., Ramakrishnan, M., Dzudzor, B., Colicelli, J. (1995). Truncated forms of a novel yeast protein suppress the lethality of a G protein alpha subunit deficiency by interacting with the beta subunit. *J. Biol. Chem.* (270): 25435-25444
- Spanu, P., Reinhardt, D., Boller, T. (1991). Analysis and cloning of the ethylen-forming enzyme from tomato by functional expression of its mRNA in *Xenopus laevis* oocytes. *EMBO J.* (10): 2007-2013

- Sprenger-Haussels, M., Weisshaar, B. (2000). Transactivation properties of parsley proline-rich bZIP transcription factors. *Plant J.* 22(1): 1-8
- Strahtmann, A., Kuhlmann, M., Heinekamp, T., Dröge-Laser, W. (2001). BZI-1 specifically heterodimerises with the tobacco bZIP transcription factors BZI-2, BZI-3/TBZF and BZI-4, and is functionally involved in flower development. *Plant J.* (28): 397-408
- Stitt, M. (1998). Pyrophosphate as an alternative energy donor in the cytosol of plant cells: an enigmatic alternative to ATP. *Bot. Acta* (111): 167-175
- Subbaiah, C.C., Bush, D.S., Sachs, M.M. (1994). Elevation of cytosolic calcium precedes anoxic gene expression in maize suspension-cultured cells. *Plant Cell* (6): 1747-1762
- Subbaiah, C.C., Zhang, J., Sachs, M.M. (1994). Involvement of intracellular calcium in anaerobic gene expression and survival of maize seedlings. *Plant Physiol.* (105): 369-376
- Subbaiah, C.C., Kollipara, K.P., Sachs, M.M. (2000). A Ca^{2+} -dependent cysteine protease is associated with anoxia-induced root tip death in maize. *J. Exp. Bot.* (51): 721-730
- Susin, S., Abián, J., Sánchez-Baera, F., Peleato, J.L., Abadia, A., Gelpi, E., Abadia, J. (1993). Riboflavin 3'- and 5'-sulfate, two novel flavins accumulating in the roots of iron-deficient sugar beet (*Beta vulgaris*). *J. Biol. Chem.* (268): 20958-20965
- Taylor, E.R., Nie, X.Z., MacGregor, A.W., Hill, R.D. (1994). A cereal hemoglobin gene is expressed in seed and root tissues under anaerobic conditions. *Plant Mol. Biol.* (24): 853-862
- Terai, H., Tsuchida, H., Mizuno, M., Matsui, N. (1998). Influence of short-term treatment with high CO_2 and N_2 on ethylene biosynthesis in tomato fruit. *Hort Science* (33): 103-104
- TerBush, D.R., Maurice, T., Roth, D., Novick, P. (1996). The Exocyst is a multiprotein complex required for exocytosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* (15): 6483-6494
- Thimm, O., Essigmann, B., Kloska, S., Altmann, T., Buckhout, T.J. (2001). Response of Arabidopsis to iron deficiency stress as revealed by microarray analysis. *Plant Physiol.* (127): 1030-1043
- Thomine, S., Zimmermann, S., Guern, J., Barbier-Brygoo, H. (1995). ATP-dependent regulation of an anion channel at the plasma membrane of protoplasts from epidermal cells of Arabidopsis hypocotyls. *Plant Cell* (7): 2091-2100

- Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., Higgins, D.G. (1997). The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucl. Acid. Res.* (24): 4876-4882
- Thrower, J.S., Blalock, R., Klinman, J.P. (2001). Steady-state kinetics of substrate binding and iron release in tomato ACC oxidase. *Biochemistry* (40): 9717-9724
- Töpfer, R., Schell, J., Steinbiss, H.-H. (1988). Versatile cloning vectors for transient gene expression and direct gene transfer in plant cells. *Nucl. Acid. Res.* (16): 8725
- Trevaskis, B., Watts, R.A., Andersson, C.R., Illellwyn, D.J., Hargrove, M.S., Olson, J.S., Dennis, E.S., Peacock, W.J. (1997). Two hemoglobin genes in *Arabidopsis thaliana*: the evolutionary origins of leghemoglobins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (94): 12230-12234
- van Dongen, J.T., Schurr, U., Pfister, M., Geigenberger, P. (2003). Phloem metabolism and function have to cope with low internal oxygen. *Plant Physiol.* (131): 1529-1543
- Vert, G., Briat, J.F., Curie, C. (2002). Arabidopsis *IRT2* gene encodes a root-periphery iron transporter. *Plant J.* (26): 181-189
- Wellmer, F., Schäfer, E., Harter, K. (2001). The DNA binding properties of the parsley bZIP transcription factor CPRF4a are regulated by light. *J. Biol. Chem.* (276): 6274-6279
- Xie, Q., Frugis, G., Colgan, D., Chua, N.-H. (2000). Arabidopsis NAC1 transduces auxin signal downstream of TIR1 to promote lateral root development. *Genes and Development* (14): 3024-3036
- Zanetti, M.E., Terrile, M.C., Arce, D., Godoy, A.V., Segundo, B.S., Casalongue, C. (2002). Isolation and characterization a potato cDNA corresponding to a 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) oxidase gene differentially activated by stress. *J. Exp. Bot.* (53): 2455-2457
- Zeng, Y., Wu, Y., Avigne, W.T., Koch, K.E. (1998). Differential regulation of sugar-sensitive sucrose synthases by hypoxia and anoxia indicate complementary transcriptional and posttranscriptional regulation. *Plant Physiol.* (116): 1573-1583
- Zeng, Y., Wu, Y., Avigne, W.T., Koch, K.E. (1999). Rapid repression of maize invertases by low oxygen. Invertase/sucrose synthase balance, sugar signaling potential, and seedling survival. *Plant Physiol.* (121): 599-608
- Zhang, J., Van Toai, T., Huynh, L., Preiszner, J. (2000). Development of flooding-tolerant *Arabidopsis thaliana* by autoregulated cytokinin production. *Mol. Breeding* (6): 135-144

Zitomer, R.S., Lowry, C.V. (1992). Regulation of gene expression by oxygen in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Rev.* (56): 1-11

7. Anhang

7.1 Yeast Two Hybrid Analyse der ANA Aktivierungsdomäne

Probe	OD ₆₀₀	t [min]	OD ₄₂₀	β-Gal-Einheiten	Mittelwert	Stabw	β-Gal Aktivität [%]	Stabw [%]
pCL1	1,103	6	0,213	64,37	76,87	12,83	100	16,69
			0,197	59,53				
		0,753	8	0,266				
	0,28			92,96				
	1,17		5	0,275				
		0,229		78,29				
				0,209				
	0,201			68,72				
	ANA ₁₋₃₀₁	0,959	30	0,277				
0,276				19,19				
0,268				18,63				
0,854		35	0,214	14,32				
			0,261	17,46				
			0,227	15,19				
ANA ₁₋₁₆₆	1,012	1100	0,241	0,43	0,41	0,02	0,5	0,02
			0,231	0,42				
			0,22	0,40				

7.2 Funktionelle Analyse von ANA durch transiente Coexpression

Ein Reporterkonstrukt (35S-GUS) wurde entweder ohne oder mit Effektor (35S-ANA) durch die Partikelkanone in Tabak-Blattmaterial cotransformiert (Kapitel 2.15.2.2). Die β -Glucuronidase-Aktivität wurde ermittelt (Kapitel 2.15.2.6). Experimente, die an unterschiedlichen Tagen durchgeführt wurden, sind durch eine doppelte Linie von einander getrennt.

Probe	Protein [$\mu\text{g}/\mu\text{l}$]	LUC	LUC'	LUC' _{kor.}	RLU	GUS ₂₀	GUS ₄₀	GUS ₈₀	FU _{rel} [FU*min ⁻¹ *mg ⁻¹]	FU _{korr} [FU*min ⁻¹ *mg ⁻¹]	GUS [pmol 4-MU* min ⁻¹ *mg ⁻¹]	GUS' [pmol 4-MU* min ⁻¹ *mg ⁻¹]	Mittelwert	Stabw
35S-GUS	4,78	1281	5363,57	3690,76	0,23	1406	3006	4587	3329,73	3253,00	110,99	482,87	736	212,7
35S-GUS	3,50	584	3333,97	1661,16	0,10	854	1952	3113	3224,07	3147,34	107,47	1038,80		
35S-GUS	4,03	1204	5975,19	4302,38	0,27	2377	5322	8097	7096,77	7020,05	236,56	882,86		
35S-GUS	4,38	1676	7647,15	5974,34	0,37	2380	5344	8378	6841,83	6765,10	228,06	612,94		
35S-ANA, 35S-GUS	3,51	524	2988,59	1315,78	0,08	369	858	1291	1314,64	1237,91	43,82	534,76	335	229,9
35S-ANA, 35S-GUS	4,81	2093	8696,68	7023,86	0,44	2135	4534	7027	5081,72	5004,99	169,39	387,23		
35S-ANA, 35S-GUS	3,72	752	4046,64	2373,83	0,15	994	2218	3414	3255,61	3178,88	108,52	734,04		
35S-ANA, 35S-GUS	1,20	116	1938,18	898,18	0,06	47	72	93	192,15	91,43	6,40	114,50		
Kontrolle	4,34	363	1672,81			29	74	96	76,73					
35S-GUS	1,60	914	11456,51	10416,51	0,65	2374	5085	7334	15542,74	15442,02	518,09	798,62		
35S-GUS	2,23	1908	17096,77	16056,77	1,00	6440	9930	12970	14628,14	14527,42	487,60	487,60		
35S-GUS	2,64	908	6884,00	5844,00	0,36	1414	4542	6321	9300,61	9199,89	310,02	851,80		
35S-ANA, 35S-GUS	2,05	809	7908,11	6868,11	0,43	352	743	1626	3113,39	3012,67	103,78	242,62		
35S-ANA, 35S-GUS	1,12	419	7455,52	6415,52	0,40	117	267	551	1930,60	1829,88	64,35	161,06		
35S-ANA, 35S-GUS	1,15	429	7462,17	6422,17	0,40	104	292	569	2022,09	1921,37	67,40	168,52		
Kontrolle	1,98	101	1021,13			17	26	61	110,71					
Kontrolle	1,95	103	1058,80			13	39	49	90,72					

7.3.1 Funktionelle Analyse von ABZ1 im transienten System (unter CaMV 35S Kontrolle)

Das GUS-Reportergen wurde entweder ohne Effektor (35S-GUS), zusammen mit ABZ1 (35S-ABZ1) oder mit einem ABZ1 Fusionskonstrukt, das eine transkriptionelle Aktivierungsdomäne besitzt (35S-GAL4-ABZ1), in Tabakblättern coexprimiert (Kapitel 2.15.2.2). Die Expression der Effektoren wird durch den CaMV 35S Promotor reguliert. Experimente, die an unterschiedlichen Tagen durchgeführt wurden, sind durch einen Doppelpunkt von einander getrennt.

Probe	Protein [µg/µl]	LUC	LUC ^{norm.}	RLU	GUS ₅₀	GUS ₅₀	GUS ₅₀	FU ₅₀ [FU·min ⁻¹ ·mg ⁻¹]	FU ₅₀ [FU·min ⁻¹ ·mg ⁻¹]	GUS ⁺ [pmol 4-MU ⁺ min ⁻¹ ·mg ⁻¹]	Mittelwert	Stabwe	
35S-GUS	1.60	914	11456.51	10416.54	0.22	2374	5085	7334	15542.74	514.73	2313.63	1670	998.5
35S-GUS	2.23	1908	17096.77	16056.81	0.34	6440	9930	12970	14628.14	484.25	1412.02		
35S-GUS	2.64	908	6884.00	5844.04	0.12	1414	4542	6321	9300.61	306.66	2456.87		
35S-ABZ1, 35S-GUS	1.64	805	9823.06	8783.10	0.19	1147	2518	4011	8737.03	287.88	1534.59	1039	568.1
35S-ABZ1, 35S-GUS	2.26	1267	11192.58	10152.61	0.22	1233	2458	3602	5231.89	171.04	788.77		
35S-ABZ1, 35S-GUS	2.69	2198	16317.74	15277.78	0.33	2596	5483	8626	11191.54	369.69	1132.96		
35S-ABZ1, 35S-GUS	2.42	583	4810.23	3770.27	0.08	1159	2272	3387	4595.71	149.83	1860.67		
35S-GAL4AD-ABZ1, 35S-GUS	1.90	446	4865.37	3645.40	0.08	567	1606	2646	5460.13	178.65	2294.48	1480	1001.5
35S-GAL4AD-ABZ1, 35S-GUS	2.24	2756	24607.14	23567.18	0.50	1378	2927	4473	6908.48	226.93	450.83		
35S-GAL4AD-ABZ1, 35S-GUS	1.16	278	4796.41	3756.45	0.08	1685	2439	3217	6894.27	219.79	2739.40		
35S-GAL4AD-ABZ1, 35S-GUS	0.26	346	27115.99	26076.02	0.56	193	457	718	10286.05	339.51	609.60		
35S-GUS	1.98	101	1021.13		17.4	25.9	61.2		110.71				
Kontrolle	1.95	103	1058.80		13.2	38.9	48.5		90.72				
35S-GUS	1.13	232	4122.98	2495.38	0.05	169.8	365.4	573.9	1795.36	50.78	952.71		
35S-GUS	1.74	351	4040.06	2412.46	0.05	254.5	556.1	964.7	2043.62	59.05	1146.07		
35S-GUS	2.63	262	1993.91	366.32	0.01	149.3	284.8	447.4	567.16	9.84	1257.27		
35S-ABZ1, 35S-GUS	0.39	952	48447.84	46820.24	1.00	307	706	1051	9465.65	306.45	306.45		
35S-ABZ1, 35S-GUS	1.60	1528	19119.12	17491.52	0.37	1016	2221	3223	6903.78	6631.72	591.71		
35S-GAL4AD-ABZ1, 35S-GUS	1.31	334	5096.90	3469.31	0.07	1007	1979	3189	8324.43	8052.37	3622.38		
35S-GAL4AD-ABZ1, 35S-GUS	1.83	461	5043.21	3415.62	0.07	573	1380	2071	4096.93	127.50	1747.67		
35S-GAL4AD-ABZ1, 35S-GUS	0.47	140	5907.17	4279.58	0.09	130.4	265.6	406.2	2909.28	87.91	961.74		
35S-GAL4AD-ABZ1, 35S-GUS	1.02	353	6921.57	5293.97	0.11	608	1284	1981	6730.39	215.28	1903.93		
35S-GAL4AD-ABZ1, 35S-GUS	0.48	121	4991.75	3364.15	0.07	100.7	236.8	304.3	2099.83	60.93	847.93		
35S-GUS	1.13	106	1868.17		13.1	56.4	76.1		277.58				
Kontrolle	1.93	134	1387.02		16.7	74	119.7		266.54				
35S-GUS	2.15	250	2323.42	695.82	0.01	835	1103	1717	2049.26	59.24	3986.10		
35S-GUS	2.96	3853	30148.67	27772.82	0.59	3620	7110	10970	14377.93	466.11	785.79		
35S-GUS	1.65	1808	21936.42	19560.57	0.42	3279	6303	10000	20386.44	19991.93	1595.09		
35S-GUS	2.01	4276	42462.76	40066.91	0.86	2560	5000	10970	20878.85	20484.34	797.50		
35S-ABZ1, 35S-GUS	1.09	376	6923.22	4547.37	0.10	209	488	796	2702.08	76.92	791.97		
35S-ABZ1, 35S-GUS	1.64	608	7425.50	5049.65	0.11	188	740	1184	3041.04	88.22	817.95		
35S-ABZ1, 35S-GUS	1.26	1360	21625.06	19249.21	0.41	1479	2237	3412	7684.05	242.98	591.02		
35S-ABZ1, 35S-GUS	1.80	380	4219.41	1843.56	0.04	330	798	1310	2720.41	77.53	1969.00		
35S-GAL4AD-ABZ1, 35S-GUS	2.28	1037	9096.49	6720.64	0.14	835	1851	3550	5593.95	185.31	1291.02		
35S-GAL4AD-ABZ1, 35S-GUS	1.54	1039	13467.27	11091.42	0.24	134	1020	1925	5803.63	180.30	761.12		
35S-GAL4AD-ABZ1, 35S-GUS	1.64	3149	36365.01	35989.16	0.77	1794	3794	5922	12573.10	405.95	528.13		
35S-GUS	0.81	119	2926.71		13.1	56.4	76.1		387.36				
Kontrolle	1.28	117	1824.99		16.7	74	119.7		401.65				

7.3.2 Funktionelle Analyse von ABZ1 im transienten System (unter C1 Kontrolle)

Das GUS-Reportergen wurde entweder ohne Effektor (35S-GUS), zusammen mit ABZ1 (C1-ABZ1) oder mit einem ABZ1 Fusionskonstrukt, das eine transkriptionelle Aktivierungsdomäne besitzt (C1-GAL4-ABZ1), in Tabakblättern coexprimiert (Kapitel 2.15.2.2). Die Effektorstrukturen stehen unter der Kontrolle des C1 Promotors, um autoregulatorische Effekte von ABZ1 zu minimieren. Experimente, die an unterschiedlichen Tagen durchgeführt wurden, sind durch einen Doppelstrich von einander getrennt.

Probe	Protein [µg/µl]	LUC	LUC'	LUC' _{kor.}	RLU	GUS ₂₀	GUS ₄₀	GUS ₆₀	FU _{rel} [FU·min ⁻¹ ·mg ⁻¹]	FU _{kor.} [FU·min ⁻¹ ·mg ⁻¹]	GUS [pmol 4-MU* min ⁻¹ ·mg ⁻¹]	GUS' [pmol 4-MU* min ⁻¹ ·mg ⁻¹]	Mittelwert	Stabw
35S-GUS	1,84	710	7718,79	6327,33	0,40	800	1438	2344	4196,41	4075,71	135,86	337,99	550	325,6
35S-GUS	2,53	535	4230,92	2839,47	0,18	769	1711	2688	3793,99	3673,28	122,44	678,80		
35S-GUS	1,59	356	4469,55	3078,10	0,20	774	1779	2752	6208,41	6087,71	202,92	1037,76		
35S-GUS	1,90	371	3897,06	2505,60	0,16	648	1485	2373	4529,94	4409,23	146,97	923,37		
C1-ABZ1, 35S-GUS	2,09	577	5513,62	4122,16	0,26	876	1720	2673	4292,88	4172,17	139,07	531,08	338	143,7
C1-ABZ1, 35S-GUS	2,03	543	5343,61	3952,16	0,25	261	551	846	1439,48	1318,77	43,96	175,09		
C1-ABZ1, 35S-GUS	1,73	430	4966,31	3574,86	0,23	470	988	1623	3329,16	3208,46	106,95	470,94		
C1-ABZ1, 35S-GUS	2,20	570	5170,85	3779,39	0,24	370	810	1200	1882,37	1761,66	58,72	244,58		
C1-GAL4AD-ABZ1, 35S-GUS	2,16	366	3393,08	2001,62	0,13	214	610	1016	1858,78	1738,07	57,94	455,63	505	195,6
C1-GAL4AD-ABZ1, 35S-GUS	1,74	542	6223,92	4832,47	0,31	791	1710	2716	5526,32	5405,61	180,19	586,95		
C1-GAL4AD-ABZ1, 35S-GUS	1,14	531	9340,37	7948,91	0,50	547	1225	1995	6367,63	6246,93	208,23	412,37		
C1-GAL4AD-ABZ1, 35S-GUS	2,29	801	6998,69	5607,23	0,36	1172	2700	4298	6828,31	6707,60	223,59	627,69		
Kontrolle	3,82	266	1391,46			28,00	74,50	120,30	120,71					
35S-GUS	2,43	369	3040,37	947,50	0,31	795	1795	2589	3695,41	3509,02	116,97	381,23		
35S-GUS	2,67	408	3055,42	962,55	0,31	1483	3082	4870	6341,11	6154,72	205,16	658,21		
35S-GUS	2,13	371	3489,03	1396,16	0,45	559	1000	2093	3606,58	3420,19	114,01	252,17		
35S-GUS	2,01	338	3359,84	1266,97	0,41	478	777	1208	1814,12	1627,72	54,26	132,25		
C1-ABZ1, 35S-GUS	2,72	489	3598,23	1505,36	0,49	2450	4247	6208	6913,17	6726,78	224,23	459,98		
C1-ABZ1, 35S-GUS	2,96	768	5181,02	3088,15	1,00	2111	4378	6731	7791,77	7605,37	253,51	253,51		
C1-ABZ1, 35S-GUS	2,91	748	5133,84	3040,97	0,98	1644	3640	5711	6978,38	6791,98	226,40	229,91		
C1-GAL4AD-ABZ1, 35S-GUS	1,78	410	4600,71	2507,84	0,81	874	1921	2977	5899,57	5713,17	190,44	234,51		
C1-GAL4AD-ABZ1, 35S-GUS	2,04	335	3285,92	1193,05	0,39	1920	4023	6151	10375,18	10188,79	339,63	879,10		
C1-GAL4AD-ABZ1, 35S-GUS	3,41	724	4246,33	2153,46	0,70	2216	4902	7454	7680,35	7493,96	249,80	358,22		
C1-GAL4AD-ABZ1, 35S-GUS	2,38	481	4041,45	1948,58	0,63	1770	4060	6228	9364,23	9177,84	305,93	484,84		
Kontrolle	1,53	160	2092,87			7,30	20,10	64,30	186,40					

7.4 Vergleich der aeroben und anaeroben CaMV 35S Promotor Aktivität im transienten System

Tomaten- und Tabak-Blattmaterial wurde transient mit dem Promotor-Reportergen Konstrukt 35S-GUS transformiert (Kapitel 2.15.2.2). Nach 24-stündiger Inkubation unter aeroben und anaeroben Bedingungen wurde die GUS-Aktivität bestimmt (Kapitel 2.15.2.6). Experimente, die an unterschiedlichen Tagen durchgeführt wurden, sind durch einen Doppelstrich von einander getrennt. Zur Standardisierung der anaeroben GUS-Aktivitätswerte wurden die relativen Luciferaseinheiten der entsprechenden aeroben Proben herangezogen (RLU, grau).

Probe	Protein [µg/µl]	LUC	LUC ^{corr.}	RLU	GUS ₂₀	GUS ₆₀	GUS ₆₀	FU _{rel} [FU*min ⁻¹ *mg ⁻¹]	FU _{corr.} [FU*min ⁻¹ *mg ⁻¹]	GUS [pmol 4-MU* min ⁻¹ *mg ⁻¹]	GUS ^{corr.} [pmol 4-MU* min ⁻¹ *mg ⁻¹]	Mittelwert	Stabw	GUS- Aktivität [%]	Stabw [%]
Tomate1, aerob	5,64	4992	17712,60	0,26	172,00	324,80	445,30	242,43	62,39	2,08	8,06	3,90	2,50	100	64,1
Tomate2, aerob	4,35	12113	55649,31	0,86	125,40	252,80	397,90	312,98	132,94	4,43	5,17				
Tomate3, aerob	5,98	10274	34361,20	0,52	160,30	301,70	425,80	221,99	41,95	1,40	2,68				
Tomate4, aerob	4,21	13615	64679,33	1,00	122,80	236,30	346,10	265,20	85,16	2,84	2,84				
Tomate5, aerob	4,65	5473	23539,78	0,35	104,00	215,80	309,10	220,54	40,50	1,35	3,86				
Tomate6, aerob	4,78	8730	36552,69	0,56	93,20	190,80	277,80	193,23	13,19	0,44	0,79				
Kontrolle, aerob	4,81	335	1392,93		121,90	205,60	295,10	180,04							
Tomate1, anaerob	5,79		17712,60	0,26	123,90	246,20	329,70	177,62	25,30	0,84	3,27	2,01	0,83	52	21,2
Tomate2, anaerob	3,44		55649,31	0,86	75,60	148,80	209,80	195,25	42,93	1,43	1,67				
Tomate3, anaerob	5,58		34361,20	0,52	119,00	229,00	316,10	176,61	24,29	0,81	1,55				
Tomate4, anaerob	4,34		64679,33	1,00	99,50	189,80	256,30	180,51	28,19	0,94	0,94				
Tomate5, anaerob	4,30		23539,78	0,35	84,70	170,00	233,80	173,37	21,05	0,70	2,01				
Tomate6, anaerob	2,40		36552,69	0,56	53,70	107,00	147,80	196,01	43,69	1,46	2,62				
Kontrolle, anaerob	4,96		1392,93		96,50	178,60	247,50	152,32							
Tabak1, aerob	2,42	83655	690222,77	1,00	717,00	1354,00	2128,00	2910,48	2817,54	93,92	93,92	104,59	25,07	100	24,0
Tabak2, aerob	1,92	45439	472338,88	0,66	297,60	666,90	948,50	1691,53	1598,59	53,29	80,18				
Tabak3, aerob	1,73	52279	605081,02	0,87	458,00	863,00	1367,00	2630,21	2537,27	84,58	97,33				
Tabak4, aerob	1,37	29806	436185,37	0,61	498,00	601,00	945,00	1635,37	1542,42	51,41	84,43				
Kontrolle, aerob	1,87	3793	40572,14		9,8	23,5	44,6	92,94							
Tabak1, anaerob	1,31		690222,77	1,00		22,40	84,10	470,04	399,08	13,30	13,30	15,16	10,21	14	9,8
Tabak2, anaerob	0,55		472338,88	0,66	42,70	87,00	129,70	792,35	721,40	24,05	36,18				
Tabak3, anaerob	1,20		605081,02	0,87	41,20	84,50	133,10	382,60	311,65	10,39	11,95				
Tabak4, anaerob	1,53		436185,37	0,61	45,10	103,50	159,30	369,37	298,42	9,95	16,33				
Kontrolle, anaerob	1,75		40572,14		23,2	32,7	48	70,95							
Tabak5, aerob	2,09	10185	97324,41	0,23	246,10	525,80	767,60	1245,82	1059,42	35,31	154,84				
Tabak6, aerob	1,27	26620	419653,18	1,00	320,00	786,00	1200,00	3468,21	3281,81	109,39	109,39				
Tabak7, aerob	2,42	28697	236773,93	0,56	541,00	1088,00	1547,00	2075,08	1888,69	62,96	112,02				
Kontrolle, aerob	1,53	160	2092,87		7,30	20,10	64,30	186,40							
Tabak5, anaerob	1,70		97324,41	0,23	22,00	56,60	94,40	213,23	30,93	1,03	4,52				
Tabak6, anaerob	1,66		419653,18	1,00	106,00	209,50	326,50	663,89	481,59	16,05	16,05				
Tabak7, anaerob	1,93		236773,93	0,56	46,80	104,70	167,80	313,91	131,61	4,39	7,81				
Kontrolle, anaerob	1,35		2092,87		8,90	17,80	57,90	182,30							

7.5 Yeast Two Hybrid Analyse auf ABZ1-Interaktionspartner

Probe	OD ₆₀₀	t [min]	OD ₄₂₀	β-Gal-Einheiten	Mittelwert	Stabw	β-Gal Aktivität [%]	Stabw [%]
P53 + T	0,40	90	0,29	16,34	11,67	3,92	100	33,6
			0,29	16,40				
			0,31	17,18				
	1,04	35	0,19	10,29				
			0,17	9,52				
			0,21	11,34				
	0,60	120	0,27	7,76				
			0,30	8,73				
			0,26	7,47				
Lam + T	1,20	845	0,33	0,65	0,40	0,18	3	1,6
			0,32	0,64				
			0,31	0,62				
	0,92	1050	0,16	0,32				
			0,18	0,37				
			0,17	0,35				
	0,57	1290	0,08	0,23				
			0,08	0,23				
			0,08	0,23				
ZIP	1,90	845	0,92	1,14	0,84	0,27	7	2,3
			0,90	1,12				
			0,25	0,54				
	0,88	1050	0,26	0,57				
			0,25	0,54				
			0,38	1,04				
	0,51	1290	0,38	1,04				
			0,27	0,74				
ZIP + ATP-Synth.	0,77	90	0,44	12,68	9,63	3,35	83	28,7
			0,45	12,85				
			0,44	12,53				
	0,56	120	0,23	6,59				
			0,22	6,56				
			0,23	6,59				
ZIP + unknown	0,43	90	0,17	9,05	7,59	2,75	65	23,6
			0,18	9,15				
			0,22	11,66				
	0,49	120	0,18	5,30				
			0,18	5,27				
			0,18	5,13				
ZIP + ACC-Oxid.	0,84	90	0,38	10,11	7,54	2,73	65	23,4
			0,37	9,79				
			0,39	10,19				
	0,58	120	0,17	5,07				
			0,17	5,04				
			0,17	5,07				
Exo70	0,91	75	0,18	5,18	7,08	1,09	61	9,3
			0,28	8,17				
			0,28	8,05				
	0,65	105	0,23	6,74				
			0,24	7,03				
			0,25	7,33				
ZIP + IDS4-like	0,82	90	0,33	8,91	7,09	2,12	61	18,1
			0,34	9,13				

			0,33	9,02				
	0,57	120	0,18	5,18				
			0,17	5,07				
			0,18	5,21				
ZIP + Transducin	0,88	90	0,30	7,59	5,84	1,89	50	16,2
			0,30	7,62				
			0,30	7,47				
	0,56	120	0,14	4,22				
			0,14	3,95				
			0,14	4,19				

7.6 Katalogisierte DNA Proben

DNA-Nr.	Bezeichnung	Bemerkung
2738	pSport1-MT74	Full-size cDNA von ABZ1 in pSport1
2818	pRT103-GUS	CaMV 35S:: <i>uidA</i> ; c=1,1
2821	pRT101-LUC	Transformationskontrolle für Cotransformation; c=2,11
2827	pQE-30	<i>E. coli</i> Expressionsvektor mit 6xHis-Tag
2844	pQE-30-ABZ1 [pREP4]	ABZ1-Expressionskonstrukt; <i>Bam</i> HI/ <i>Sma</i> I
2882	pCR2.1-SSH74	<i>Rsa</i> I Fragment in pCR2.1
2888	pCR2.1-SSH172	<i>Rsa</i> I Fragment in pCR2.1
2927	pBluescript SK+	Klonierungsvektor; c=3
2940	pRT103-ABZ1 ₁₋₁₃₈ -GUS	NLS-Konstrukt; c=1,2
2941	pRT103-ABZ1 ₁₋₄₄ -GUS	NLS-Konstrukt; c=1,4
2942	pRT103-ABZ1 ₁₋₂₄ -GUS	NLS-Konstrukt; c=1,3
3051	SSH74	<i>Rsa</i> I Fragment; c=10 ng/μl
3077	pRT103-ABZ1 ₄₅₋₁₃₈ -GUS	NLS-Konstrukt; c=1,22
3091	pSport1-MT172	Full-size cDNA von ANA in pSport1
3093	SSH172	<i>Rsa</i> I Fragment; c=5-10 ng/μl
3095	RBSS1	RBSS Fragment in pCR2.1, sK1
3096	RBSS2	RBSS Fragment in pCR2.1
3097	RBSS4	RBSS Fragment in pCR2.1
3098	RBSS5	RBSS Fragment in pCR2.1
3099	RBSS6	RBSS Fragment in pCR2.1
3100	RBSS8	RBSS Fragment in pCR2.1
3101	RBSS9	RBSS Fragment in pCR2.1
3102	RBSS11	RBSS Fragment in pCR2.1
3103	RBSS1.1	RBSS Fragment in pCR2.1
3104	RBSS2.1	RBSS Fragment in pCR2.1
3105	RBSS3.1	RBSS Fragment in pCR2.1
3106	RBSS4.1	RBSS Fragment in pCR2.1
3107	RBSS5.1	RBSS Fragment in pCR2.1
3108	RBSS6.1	RBSS Fragment in pCR2.1
3109	RBSS7.1	RBSS Fragment in pCR2.1
3110	RBSS8.1	RBSS Fragment in pCR2.1
3111	RBSS9.1	RBSS Fragment in pCR2.1
3112	RBSS10.1	RBSS Fragment in pCR2.1
3114	pBT10-TATA-GUS	TATA:: <i>uidA</i> ; c=1,25
3130	pVKH-35S-ABZ1-pA1	Effektorkonstrukt für Cotransfektion; c=1,57
3148	pBT10-35S-GUS	Reporterkonstrukt für Cotransfektion; c=1,96

3161	pRT103-ANA ₁₋₃₀₁ -GUS	NLS-Konstrukt; c=1,05
3162	pRT103-ANA ₁₋₁₃₆ -GUS	NLS-Konstrukt; c=1,11
3163	pRT103-ANA ₁₋₇₆ -GUS	NLS-Konstrukt; c=1,05
3265	T7 Primer	Sequenzierprimer
3266	M13 Reverse	Sequenzierprimer
3270	pGBKT7	Bait Vektor; c=2,78
3271	pGBKT7-53	Bait Vektor als Positivkontrolle; c=2,51
3272	pGADT7-T	Prey Vektor als Positivkontrolle; c=2,11
3273	pGADT7	Prey Vektor; c=2,37
3274	pCL1	Positivkontrolle f. β -Galactosidase-Assay; c=0,89
3346	pVKH-35S-Gal4AD-ABZ1-pA1	Effektorkonstrukt für Cotransfektion; c = 2,51
3348	pGBKT7-ABZ1 ₄₇₋₁₃₈	Bait-Konstrukt; c=3,37
3391	pGBKT7-ANA ₁₋₃₀₁	Bait-Konstrukt; c=1,53
3462	pGBKT7-ANA ₁₋₁₆₆	Bait-Konstrukt; c=2,79
3464	35S-5'	Primer z. Amplifikation d. 100 bp CaMV 35S Promotorfragmentes aus pRT103-GUS (3xACGT)
3465	35S-3'	
3466	5'Gal4	
3467	3'Gal4	
3468	74/5'Primer	5'Primer z. Amplifikation v. ABZ1; <i>Bam</i> HI
3469	74/3'Primer	3'Primer z. Amplifikation v. ABZ1; <i>Sma</i> I
3470	5'ZIP- <i>Nde</i> I	5'Primer z. Amplifikation v. ABZ1 ₄₇₋₁₃₈ als Bait; <i>Nde</i> I
3476	74/5'- <i>Xho</i> I	5'Primer z. Amplifikation v. ABZ1-NLS-Konstrukten
3477	74/3'- <i>Nco</i> I	3'Primer z. Amplifikation v. ABZ1-NLS-Konstrukten
3478	74/3'-NLS- <i>Nco</i> I	3'Primer z. Amplifikation d. ABZ1 ₁₋₄₄ -NLS-Konstrukts
3479	74/3'-oNLS- <i>Nco</i> I	3'Primer z. Amplifikation d. ABZ1 ₁₋₂₄ -NLS-Konstrukts
3480	74/5'-oNLS- <i>Xho</i> I	5'Primer z. Amplifikation d. ABZ1 ₁₋₂₄ -NLS-Konstrukts
3490	ANA-3' <i>Pag</i> I-1	3'Primer z. Amplifikation d. ANA ₁₋₇₆ -NLS-Konstrukts
3491	ANA-3' <i>Pag</i> I-2	3'Primer z. Amplifikation d. ANA ₁₋₁₃₆ -NLS-Konstrukts
3492	ANA-3' <i>Pag</i> I-3	3'Primer z. Amplifikation d. ANA ₁₋₃₀₁ -NLS-Konstrukts
3493	MT172/5'	5'Primer z. Amplifikation v. ANA; <i>Bam</i> HI
3494	MT172/3'	3'Primer z. Amplifikation v. ANA; <i>Sal</i> I
3495	ANA-5' <i>Sal</i> I	5'Primer z. Amplifikation v. ANA-NLS-Konstrukten
3496	ANA-5' <i>Nde</i> I	5'Primer z. Amplifikation v. ANA ₁₋₃₀₁ als Bait; <i>Nde</i> I
3497	ANA-3' <i>Sal</i> I	3'Primer z. Amplifikation v. ANA ₁₋₁₆₆ als Bait; <i>Sal</i> I
3498	35S-3'	Sequenzierprimer aus CaMV 35S Promotor in 3'Richtung
3519	CaMV 35S	Ca. 100bp Fragment in pCR2.1 (3xACGT)
3522	Oligo RBSS1.1	Oligo für spezifischen EMSA-Kompetitor
3523	Oligo RBSS1.2	Oligo für spezifischen EMSA-Kompetitor

3524	Oligo RBSS1.3	Oligo für unspezifischen EMSA-Kompetitor, uK1
3525	Oligo RBSS1.4	Oligo für unspezifischen EMSA-Kompetitor, uK1
3578	pVKH-35S-pA1	c=1,75
3666	pC1L-1097	Transformationskontrolle für Cotransformation; c=2,25
3767	M13 Forward	Sequenzierprimer
3776	pVKH-C1-pA1	c=2,38
3777	pVKH-C1-ABZ1-pA1	Effektorkonstrukt für Cotransfektion; c = 2,45
3778	pVKH-C1-Gal4AD-ABZ1-pA1	Effektorkonstrukt für Cotransfektion; c = 3,48
3781	pVKH-35S-ANA-pA1	Effektorkonstrukt für Cotransfektion; c = 1,76
3825	<i>uidA</i>	Sequenzierprimer aus <i>uidA</i> in 5' Richtung; Cy5; 24pmol/μl
3889	pQE-30-ANA [pREP4]	ANA-Expressionskonstrukt; <i>Bam</i> HI/ <i>Sa</i> I
3931	YTH42-5'	5' Primer z. Amplifikation d. LeACO5 Peptids
3932	YTH42-3'	3' Primer z. Amplifikation d. LeACO5 Peptids
3933	YTH16-5'	5' Primer z. Amplifikation d. AIL Peptids
3934	YTH16-3'	3' Primer z. Amplifikation d. AIL Peptids
3935	ABZ1-Mu2/5'	5' Primer z. Amplifikation v. ABZ1-Mu2
3936	ABZ1-Mu1/3'	3' Primer z. Amplifikation v. ABZ1-Mu1
3959	IDS-intern2	Sequenzierprimer des AIL cDNA Klons
3971	pCR2.1-ABZ1 ₁₋₁₀₀	ABZ1 ₁₋₁₀₀ Expressionskonstrukt
3972	pCR2.1-ABZ1 ₄₇₋₁₃₈	ABZ1 ₄₇₋₁₃₈ Expressionskonstrukt
3973	pSport1-AIL	Full-size cDNA von AIL in pSport1
3974	pQE-30-ABZ1 ₁₋₁₀₀ [pREP4]	ABZ1 ₁₋₁₀₀ Expressionskonstrukt
3975	pQE-30-ABZ1 ₄₇₋₁₃₈ [pREP4]	ABZ1 ₄₇₋₁₃₈ Expressionskonstrukt
3976	YTH16	PCR-Fragment; c=0,03
3977	YTH42	PCR-Fragment; c=0,1
3978	pGADT7-Rec3 (Exo70)	Selektiertes Prey-Plasmid
3979	pGADT7-Rec16 (AIL)	Selektiertes Prey-Plasmid; c=0,77
3980	pGADT7-Rec25 (Transducin)	Selektiertes Prey-Plasmid; c=1,11
3981	pGADT7-Rec34 (ATP-Synth.)	Selektiertes Prey-Plasmid; c=0,87
3982	pGADT7-Rec42 (LeACO5)	Selektiertes Prey-Plasmid; c=1,32
3983	pGADT7-Rec84 (LeACO5)	Selektiertes Prey-Plasmid

7.7 Katalogisierte Glycerinkulturen

Glycerin-kultur-Nr.	Bezeichnung	Bemerkung
1799	pRH608 (I ₂)	Agro EHA 101, pUK 4030
1803	pOCA28-35S-GUS	Agro EHA 101
2081	cDNA-Bank (pSport1)	ElectroMax DH 10B
2082	cDNA-Bank (pSport1)	ElectroMax DH 10B
2083	cDNA-Bank (pSport1)	ElectroMax DH 10B
2158	pQE-30-ABZ1 [pREP4]	BL21 (DE3) RIL Codon Plus; pACYC
2189	pCR2.1-SSH172	INV α F'
2201	BL21 (DE3) RIL Codon Plus	<i>E. coli</i> Expressionsstamm
2322	pRT103-ABZ1 ₁₋₁₃₈ -GUS	XL1 blue
2323	pRT103-ABZ1 ₁₋₄₄ -GUS	XL1 blue
2324	pRT103-ABZ1 ₁₋₂₄ -GUS	XL1 blue
2325	pCR2.1-RBSS1	INV α F'
2326	pCR2.1-RBSS2	INV α F'
2328	pCR2.1-RBSS4	INV α F'
2329	pCR2.1-RBSS5	INV α F'
2330	pCR2.1-RBSS6	INV α F'
2331	pCR2.1-RBSS8	INV α F'
2332	pCR2.1-RBSS9	INV α F'
2333	pCR2.1-RBSS11	INV α F'
2336	pCR2.1-RBSS1.1	INV α F'
2337	pCR2.1-RBSS2.1	INV α F'
2338	pCR2.1-RBSS3.1	INV α F'
2339	pCR2.1-RBSS 4.1	INV α F'
2340	pCR2.1-RBSS 5.1	INV α F'
2341	pCR2.1-RBSS6.1	INV α F'
2343	pCR2.1-RBSS 8.1	INV α F'
2344	pCR2.1-RBSS 9.1	INV α F'
2384	pRT103-ABZ1 ₁₄₅₋₁₃₈ -GUS	XL1 blue
2385	pSport1-MT172	Full-size cDNA von ANA; DH 10B
2390	pCR2.1-ANA	INV α F'
2394	pCR2.1-RBSS10.1	INV α F'
2395	pSport1-MT74	Full-size cDNA von ABZ1; DH 10B
2413	pRT103-ANA ₁₋₃₀₁ -GUS	XL1 blue
2414	pRT103-ANA ₁₋₁₃₆ -GUS	XL1 blue
2415	pRT103-ANA ₁₋₇₆ -GUS	XL1 blue
2453	pVKH-35S-Gal4AD-ABZ1-pA1	XL1 blue

2455	pGBKT7-ZIP	XL1 blue
2456	pQE-30-ANA [pREP4]	M15
2463	pCR2.1-ANAbait	INV α F'
2466	pGBKT7-ANA ₁₋₃₀₁	XL1 blue
2545	pCR2.1-ANA ₁₋₁₆₆	INV α F'
2571	pGBKT7- ANA ₁₋₁₆₆	XL1 blue
2573	pCL1	AH109
2574	pGBKT7	AH109
2575	pGBKT7-ANA ₁₋₃₀₁	AH109
2576	pGBKT7-ANA ₁₋₁₆₆	AH109
2577	pGBKT7-ZIP	AH109
2582	pCR2.1-35S	INV α F'
2644	pC1L-1097	XL1 blue
2645	pVKH-C1-pA1	XL1 blue
2646	pVKH-C1-ABZ1-pA1	XL1 blue
2647	pVKH-C1-GAL4AD-ABZ1-pA1	XL1 blue
2679	pVKH-35S-ANA-pA1	XL1 blue
2697	pQE-30-ANA [pREP4]	BL21 (DE3) RIL Codon Plus; pACYC
2748	pSport1-LeACO5	Full-size cDNA in DH 10B
2749	pSport1-AIL	Full-size cDNA in DH 10B
2760	pQE-30-ABZ1-Mu2 [pREP4]	BL21 (DE3) RIL Codon Plus; pACYC
2761	pQE-30-ABZ1-Mu1 [pREP4]	BL21 (DE3) RIL Codon Plus; pACYC
2787	pSport1-LeACO5	Full-size cDNA ; DH 10B
2788	pGADT7-Rec16	XL1 blue
2789	pGADT7-Rec42	XL1 blue
2790	pGADT7-Rec34	XL1 blue
2791	pSport1-AIL	Full-size cDNA; DH 10B

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Reinhard Hehl, meinem Mentor, für die Bereitstellung des interessanten Themas, seine ständige Diskussionsbereitschaft und seine konstruktiven Vorschläge, die wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Insbesondere möchte ich ihm für die Möglichkeit der Teilnahme an zwei internationalen Kongressen danken.

Herrn Prof. Dr. Ralf-Rainer Mendel danke ich für das Interesse an dieser Arbeit und die Bereitschaft, das Koreferat zu übernehmen. Außerdem möchte ich ihm für die Möglichkeit danken, die Einrichtungen seines Instituts zu nutzen.

Herrn Dr. Robert Hänsch danke ich für die Betreuung im Umgang mit der Partikelkanone sowie seine jederzeit geduldige Diskussionsbereitschaft bei der Auswertung der transienten Transformationsexperimente.

Allen Mitarbeitern des Instituts für Genetik möchte ich einen ganz besonderen Dank für die wirklich überaus angenehme und freundschaftliche Arbeitsatmosphäre aussprechen. Insbesondere gilt mein Dank meinen Kollegen der Arbeitsgruppe Hehl für ihre motivierenden Diskussionen, wichtigen Anregungen und Hilfsbereitschaft.

Dr. Jörn Petersen möchte ich für die Hilfe bei der Erstellung des phylogenetischen Stammbaums danken.

Für Rat und Tat bei den Fluoreszenz-mikroskopischen Aufnahmen, Western Blot Analysen und für Tipps im Umgang mit Hefen möchte ich Claudia Bottner danken.

Kristin Schnettler danke ich für die Erstellung einer genomischen Bank aus Tomate.

Ein ganz besonders herzlicher Dank gilt meiner Familie und meinen Freunden für ihr Verständnis und ihre Unterstützung in jeglicher Hinsicht.

Lebenslauf

Name: Simone Sell
Geburtsdatum: 16.07.1973
Geburtsort: Kassel
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig

Schulbildung:

1980 - 1984 Grundschule „Brüder-Grimm-Schule“, Baunatal-Rengershausen
1984 - 1993 Gymnasium „Wilhelmschule“, Kassel
1993 Abitur

Berufsausbildung:

1993 - 1995 Ausbildung zur Biologisch-Technischen Assistentin
Berufliche Schulen des Hochsauerlandkreises, Olsberg

Studium:

1995 - 2000 Diplomstudiengang Biotechnologie an der TU Braunschweig
1997 Vordiplom, TU Braunschweig
1998 - 1999 Studienarbeit am Institut für Pharmazeutische Biologie, TU BS
1999 - 2000 Diplomarbeit am Institut für Genetik, TU Braunschweig
Studienabschluss: Diplom-Biotechnologin am 28.06.2000

Dissertation:

seit Juli 2000 Beginn der experimentellen Arbeiten am Institut für Genetik
(AG Prof. Dr. Hehl), TU Braunschweig

Veröffentlichungen:

Geffers, R.; Sell, S.; Cerff, R.; Hehl, R. (2001). The TATA box and a Myb binding site are essential for anaerobic expression of a maize *GapC4* minimal promoter in tobacco. *Biochimica et Biophysica Acta* (1521): 120-125

Kaiser, A.; Sell, S.; Hehl, R. (2002). Heterologous expression of a bacterial homospermidine synthase gene in transgenic tobacco: effects on the polyamine pathway. *Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem.* (4): 1-9